Die Grundlagen des Eiweissfehlers von Methylorange.

(Ein Beitrag zur Kenntnis des Kolloidfehlers der Indikatoren.)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät der Philipps-Universität

zu Marburg

vorgelegt von

Guido Schulz

aus Barmen

Marburg 1931.

Die Grundlagen des Eiweissfehlers von Methylorange.

(Ein Beitrag zur Kenntnis des Kolloidfehlers der Indikatoren.)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät der Philipps-Universität

zu Marburg

vorgelegt von

Guido Schulz
aus Barmen

Marburg 1931.

Berichterstatter: Professor Dr. A. T h i e l.

Von der Philosophischen Fakultät der Universität Marburg

als Dissertation angenommen am 29.7.1931.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.1931.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

R.UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meiner lieben Mutter
und dem Andenken meines
Vaters.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555603_0101

Die Grundlagen des Eiweissfehlers von Methylorange.

(Ein Beitrag zur Kenntnis des Kolloidfehlers der Indikatoren.)

I n h a l t:

A.) Einleitung.

B.) Das untersuchte Material:

1.)Methylorange,

2.)Die Eiweisskörper; Herstellung und Konservierung der Lösungen:

a.)Pepton Witte,

b.)Casein aus Kuhmilch,

c.)genuines Hühnereiweiss.

C.) Messmethoden:

1.)Optisch

a.)Apparatur,

b.)Schwierigkeiten und Genauigkeit der Methode.

2.)elektrisch

a.)Apparatur,

b.)mit Kollodium geschützte Wasserstoffelektrode,

c.)ein neuer potentiometrisch messbarer Effekt.

D.) Messungen, Tabellen und Kurven:

1.)Pepton-Versuche,

2.)Casein-Versuche,

3.)Hühnereiweiss-Versuche.

E.) Übersicht über die Ergebnisse und Versuch einer Erklärung der Halbwertstufenverschiebung.

F.) Anhang: Eine neue Reihe von Stufenlösungen mit konstantem Elektrolytgehalt.

Die Grundlagen des Eiweissfehlers von Methylorange.

(Ein Beitrag zur Kenntnis des Kolloidfehlers der Indikatoren.)

A.) Einleitung:

Bei der colorimetrischen Bestimmung von Wasserstoffionenaktivitäten mittels Indikatoren erhält man bei Gegenwart von Eiweissstoffen meistens Werte, die in auffälligem Gegensatze zu denen stehen, die mit Hilfe der elektrischen Methode gemessen werden. Wenn auch im allgemeinen zur Klärung physiologischer Vorgänge keine allzu grossen Anforderungen an die Genauigkeit gestellt werden, so sind die Abweichungen häufig doch so gross, dass die zulässigen Messfehler weit überschritten werden. Der erste, der über den Eiweissfehler systematisch Untersuchungen anstellte, war S. P.L. S ö r e n s e n[1]! . Er fand, dass die Stufen je nach Indikator und Eiweisskörper entweder zur alkalischen oder sauren Seite verschoben werden. Die Stufenänderung zum alkalischen Gebiete hin ist die häufigere, doch lässt sich in den ganzen Versuchsreihen eine Gesetzmässigkeit weder aus der chemischen Natur der Indikatoren und der Eiweissstoffe noch aus ihren physikalisch-chemischen Konstanten, wie der isoelektrischen Punkte, der Halbwertstufe u.s.w. erkennen. Bei einzelnen Indikatoren kann sogar der Umschlag je nach zugesetztem Eiweisskörper bald nach der sauren, bald nach der alkalischen Seite hin erfolgen.

Später wurden diese Untersuchungen von den verschiedensten Forschern[2] erweitert, wobei aber im allgemeinen nur der Zweck verfolgt wurde, für biologische Stufenmessungen solche Indikatoren zu finden, bei denen die Abweichungen von den elektrisch

1.) S ö r e n s e n: Compt. rend. du Lab. de Carlsberg 8,1.(1909) deutsch: Biochem.Ztschr.21.(1909).

2.) u.a.S. P a l i t z s c h: Compt.rend.du Lab. de Carlsberg 10,162 (1911).
L.M i c h a e l i s: Dtsch.med.Wochenschr. 48, 252 (1922).
Ztschr.f.d.ges.exper.Med.26, 149 (1922)
L.E.B a y l i s s,E.J.C o n v a y u.R.V e r n e y:Journ. of physiol. 58, 101 (1923)
D. J a u m i n: Cpt.rend.de biologie 93, 860 (1925)
I.H.A u s t i n, W.C. S t a d i e u. H.W. R o b i n s o n: Journ.of biol.chem. 66, 505 (1925)
E.H. L e p p e r, C.I.M a r t i n: Biochem.Journ.21, 356 (1927)
A.G u t b i e r:Koll.Ztschr.41, 1 (1927)

gemessenen Werten möglichst klein sind,und für die anderen Farbstoffe Korrekturwerte einzuführen. Aus diesem Grunde wurden die Indikatoren nur in ihrem Umschlagsgebiet gemessen, und es fanden sich tatsächlich einige, die den gestellten Anforderungen gerecht wurden. Es zeigte sich, dass die Indikatoren einen desto kleineren Eiweissfehler haben, je einfacher die chemische Zusammensetzung ist (z.B.p-Nitrophenol).Auf Grund solcher Arbeiten empfahl M i c h a e l i s eine Reihe von einfarbigen Indikatoren, in der hauptsächlich die verschiedenen Nitrophenole vertreten sind.

Der Eiweissfehler wurde dadurch erklärt, dass die elektrisch geladenen kolloiden Teilchen den einen der farbigen Anteile stärker adsorbieren als den anderen und dadurch das Gleichgewicht stören.

Später zeigten A. T h i e l und Mitarbeiter [1], dass nur die quantitative Ausmessung der spektralen Absorptionskurven bei allen Fragen der Indikatorenforschung eine einwandfreie Aufklärung bringen kann.

Auch bei den Eiweissfehlern ergab sich die Forderung, die möglichen Änderungen der Absorptionskurven quantitativ zu verfolgen. Nebenher musste natürlich die Änderung der Wasserstoffionenaktivität mit Hilfe der elektrischen Fundamentalmethode gemessen werden.

Als Eiweisskörper wurden untersucht:

1.) Pepton Witte als Vertreter eines Abbauproduktes,

2.) Caseïn aus Kuhmilch nach H a m m e r s t e n als typisches Proteïn und

3.) genuines Hühnereiweiss als physiologisches Gemisch verschiedener Proteïne.

Die Messungen beschränkten sich auf Methylorange als Indikator.

1.) A. T h i e l, A. D ä s s l e r und F.W ü l f k e n: Fortschritte der Chemie, Physik und phys.Chemie Bd.18, Heft 3 (1924).

B. Das untersuchte Material.

1.) Das Methylorange.

Über den Eiweissfehler des Methylorange lagen bereits einige Zahlenangaben von S.P.L.Sörensen vor. Der Vergleich mit den elektrisch gemessenen Werten ergab bei Leimlösungen, Pepton Witte, Hühnereiweiss und pepsingespaltenem Hühnereiweiss in salzsauren Lösungen, die im Umschlagsgebiet dieses Indikators liegen, dass die Stufe nach der alkalischen Seite verschoben erscheint.

Das benutzte Präparat war von Kahlbaum geliefert, wurde viermal aus Wasser umkristallisiert und bei 120° C über P_2O_5 getrocknet. Bei der Nachprüfung der Grenzkurven in eiweissfreier Lösung zeigte sich, dass fast alle Werte ca. 2-3 % unter den von G. Coch [1] und ca. 5-6 % unter den von A. Dassler [2] gemessenen lagen. Bei Wellenlängen >513mμ liegen dagegen meine Werte der gelben Grenzkurve ca. 4 % höher (Tabelle 1; angegeben sind die Durchschnittswerte aus verschiedenen Messungen.)

Da diese Abweichungen auf Verunreinigungen beruhen konnten, wurde das Präparat auf folgende Weise gereinigt: Das Kahlbaum'sche Präparat wurde in heissem Wasser gelöst und die freie Säure mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und abfiltriert. Der Rückstand wurde zweimal mit Äthylalkohol unter Rückfluss gekocht, abgesaugt, in heisser Natronlauge gelöst und mit Tierkohle (Carbo medicinalis Merck)eine Stunde gekocht. Nach Erkalten wurde dann schliesslich das auskristallisierte Natriumsalz abgesaugt, noch viermal aus Wasser umkristallisiert und bei 120°C über P_2O_5 im Vakuum getrocknet. Trotzdem zeigte das Präparat wieder innerhalb der Versuchsfehler

---

1.) G. Coch: Zur Kenntnis des Salzfehlers der Indikatoren, Diss.Marburg 1930.

2.) A. Thiel, A. Dassler und F. Wülfken loc.cit.S. 21.

die gleichen Grenzkurven. Auffallend ist die wiederum gute Übereinstimmung mit dem Dassler'schen Werte bei 513 mμ in stark salzsauren Lösungen (ca. 8.0 n.), wo ε = 0,504 $\cdot 10^5$ gemessen wurde gegen einen Wert von Dassler, der zwischen 0,506$\cdot 10^5$ (1,0 HCl) und 0,510 $\cdot 10^5$(10 n HCl) liegt (s.Tb.22). Die von mir gemessenen Werte entsprechen den von G.C o c h [1] ebenfalls mit einem Kahlbaum'schen Präparat erhaltenen. Dieses so gereinigte Methylorange wurde bei allen Messungen benutzt. Die sonstigen Unstimmigkeiten können vorläufig nicht erklärt werden.

2.) Die Eiweisskörper,Herstellung und Konservierung der Lösungen.

a.) Pepton Witte.

Von einem gereinigten Trockenpräparat von Kahlbaum-Schering wurden drei vierprozentige Stammlösungen in 0.1 n HCl, 2 n CH_3COOH und 0,04 n NaOH angesetzt. Alle drei Lösungen waren zunächst noch durch geringe Verunreinigungen getrübt und wurden durch gewöhnliche Faltenfilter filtriert. Glasfilter waren unbrauchbar,da sich die Poren sofort verstopften.Die ersten Anteile liefen zwar noch trübe durch und wurden deshalb einigemale zu dem noch nicht filtrierten Teil zurückgegossen. Allmählich wurde das Filter aber dichter, und die Lösung lief zwar sehr langsam aber klar durch(ein Liter in 24-36 Stunden). Zum Schutze der Pepton-Natronlaugelösung gegen Kohlensäure der Luft wurde die Filtration unter einer grossen Glasglocke neben Natronkalk vorgenommen.

Um Eiweisslösung vor Fäulnis zu schützen, konnte eine zufällige Beobachtung ausgenutzt werden. Es war vergessen worden,eine Elektrode zu entleeren. Als nach längerer Zeit diese Elektrode wieder benutzt werden sollte, zeigte sich, dass die in der Wasserstoffatmosphäre aufbewahrte alkalische Caseïnlösung noch vollständig klar und geruchlos war, während der in gewöhnlicher Luft aufbewahrte Teil der Lösung längst

---

1) G. C o c h, loc.cit.

in Fäulnis übergegangen war. Diese Erscheinung veranlasste folgenden Versuch:

Eine frisch hergestellte Caseïnlösung wurde in eine Waschflasche mit Schliffhähnen eingefüllt und mit einem Tropfen bereits fauler Caseïnlösung versetzt. Darauf wurde 5 Stunden lang Wasserstoff durchgeleitet. Zwischen Waschflasche und Wasserstoffentwickler war noch ein dünnes Quarzrohr geschaltet, das schwach ausgeglüht war. Die Gummiverbindungen waren in Sublimatlösung ausgekocht. Nach etwa drei Wochen konnte noch keine Fäulnis wahrgenommen werden. Die Lösung war in der Durchsicht noch ebenso klar wie vorher. Darauf wurde durch die Waschflasche ein schwacher Luftstrom gesaugt, um den Wasserstoff zu verdrängen. Zur Sterilisierung wurde die Luft vor Eintritt in die Lösung durch das glühende Quarzrohr geleitet. Obwohl also eine Neuinfektion des Caseïns ausgeschlossen war, trübte sich die Lösung nach einigen Tagen und es trat der bekannte Fäulnisgeruch auf. Dadurch wurde bewiesen, dass die Fäulniserreger durch den Wasserstoff nicht abgetötet, sondern nur in ihrem Wachstum behindert werden. Weil die Lösungen im allgemeinen nur bis zu optischen Messung aufbewahrt werden sollten, genügte diese Art von Konservierung den gestellten Anforderungen vollauf.

b.) Caseïn aus Kuhmilch.

Die Selbstherstellung der für optische Messungen erforderlichen, in der Durchsicht klaren Caseïnlösungen scheiterte trotz zahlreicher Versuche vollkommen mangels geeigneter Apparaturen. Aus dem von Kahlbaum bezogenen Präparat " Caseïn nach Hammersten " erhielt ich nach tagelangem Schütteln mit 0,01 n NaOH nur vollständig trübe Lösungen, die sich nicht klar filtieren liessen und im Caseïngehalt stark schwankten. Ausserdem hätte die Sterilisierung grosse Schwierigkeiten bereitet, da die Lösungen keine Zusätze wie Toluol, Chloroform oder gar Phenole enthalten durften; denn S ö r e n s e n [1]

1.) S ö r e n s e n, loc. cit. S.195 und 211.

konnte zeigen, dass durch solche Mittel die Sicherheit der elektrischen und optischen Messungen in Frage gestellt werden kann. Von den B e h r i n g w e r k e n wurden mir liebenswürdigerweise 10 Liter einer ca. 5%igen sterilen Caseïn - lösung zur Verfügung gestellt. Die Lösung war in Jenaer Fläschen (von je 100 ccm Inhalt) mit Gummistopfen abgefüllt worden. Nach Angabe der Firma war das Caseïn in $NaHCO_3$(ca 2%) ohne weitere Zusätze gelöst und,durch Bakterienfilter filtriert, in die ausgekochten Flaschen abgefüllt worden. Die Lösungen waren von gelber Farbe, in der Durchsicht völlig klar und geruchlos. Nur in einigen Flaschen hatten sich nach langer Zeit geringe Niederschläge abgesetzt. Diese wurden natürlich nicht benutzt.

Wegen des Natriumbicarbonatgehaltes konnte die Lösung nicht ohne weiteres benutzt werden. Deshalb wurde das Natriumbicarbonat mit der äquivalenten Menge n HCl in NaCl übergeführt und das ausgefällte Caseïn in Natronlauge bzw. Essigsäure wieder gelöst.

Analyse der Caseïnlösung:

1.) Caseïnbestimmung: Angewandt wurde die Methode der Stickstoffbestimmung nach K j e l d a h l . Bei der Umrechnung auf Caseïn wurde der von H a m m e r s t e n angegebene Wert[1] von 15,65 % Stickstoffgehalt eingesetzt. Bei drei Bestimmungen wurden je 20 ccm der Caseïnlösung im Kjeldahlkolben auf dem Wasserbade eingedampft. Die Wasserdämpfe wurden durch ein eingeführtes Glasrohr abgesaugt, um Kondensation in dem langen Halse zu vermeiden. Darauf wurde der Rückstand wie üblich mit rauchender Schwefelsäure in der Hitze zersetzt, zu der Lösung zuerst Wasser, dann konz. Natronlauge gegeben und das Ammoniak in eine Vorlage mit eingestellter Schwefelsäure übergetrieben. Die unverbrauchte Säure wurde darauf

1.) H a m m e r s t e n: Lehrbuch der physiol.Chem. 10.Auflg. S. 511 (1922)

mit Natronlauge zurücktitriert.

Es wurde gefunden: 4,28 % Caseïn
4,33 % "
4,33 % "

Im Mittel 4,31 % Caseïn.

2.) Natriumbestimmung: Zur Bestimmung des Natriumgehaltes wurden je 10 ccm Lösung im gewogenen Platintiegel eingedampft, der Rückstand verascht, mit Schwefelsäure abgeraucht, schwach geglüht und das Natrium als Na_2SO_4 gewogen.

Es wurde gefunden: 0,1744 gr Na_2SO_4
0,1720 gr "
0,1718 gr "

Im Mittel 0,1727 gr Na_2SO_4, entspr.
2,04 % $NaHCO_3$ oder
0,56 % Na^+.

Meist wurde von einprozentigen Stammlösungen ausgegangen. Mit Gummiballgebläse wurden 25,0 ccm der Behring'schen Caseïn-Lösung aus der Vorratsflasche durch ein Allihn'sches Rohr mit Jenaer Glasfilter in eine geeichte Auslaufpipette gedrückt und in ein tariertes Kölbchen von 107,8 ccm[1] umgefüllt. Darauf wurde die dem Natriumgehalte äquivalente Menge Salzsäure zugegeben, worauf das Caseïn ausflockte. Durch das gebildete NaCl wird allerdings unter Umständen ein kleiner Neutralsalzfehler verursacht, der aber wegen der geringen Konzentration (0,060 n NaCl bei einprozentiger Lösung) so gering ist, dass er vernachlässigt werden kann. Ausserdem war es möglich, dass das Caseïn als amphotere Verbindung teilweise mit der freiwerdenden Kohlensäure reagiert, wodurch sich ein Teil der Kohlensäure der nachfolgenden Beseitigung entzogen hätte. Deshalb wurde ein Vorversuch gemacht. 25 ccm Caseïnlösung wurden wie gewöhnlich mit 11,16ccm 0,5 n HCl versetzt und in die Lösung mehrere Tage lang CO_2

1.) 25 ccm der 4,31 %igen Behring'schen Caseïnlösung auf 107,8 ccm verdünnt, ergibt eine genau einprozentige Stammlösung.

eingeleitet. Im Filtrat konnte jedoch kein Caseïn nachgewiesen werden.Letzteres Bedenken war also ebenfalls hinfällig.

Um eine Hitzezersetzung zu vermeiden, wurde die Kohlensäure nicht etwa durch Auskochen der Lösung entfernt, sondern mit einer Wasserstrahlpumpe durch Evakuieren abgesaugt. Zunächst wurde das Vakuum nur soweit getrieben, dass der Schaum etwa bis zur Hälfte des Kolbenhalses reichte. Nach einiger Zeit (ca.30 Minuten) waren die meisten Blasen verschwunden und das Auspumpen wurde nach Einlassen von Luft mehrere Male wiederholt, wobei der Luftdruck allmählich bis auf ca 15 mm Hg erniedrigt werden konnte. Schliesslich bildeten sich unter Sieden der Flüssigkeit nur noch einzelne grosse Blasen, die aber schnell platzten. Das Auspumpen wurde dann noch etwa 1 Stunde fortgesetzt (Gesamtdauer ungefähr 5-6 Stunden).

Das ausgefällte Caseïn wurde wieder gelöst und der Kolben auf 107,8 ccm aufgefüllt. Von dieser einprozentigen Lösung wurden die anderen durch entsprechende Verdünnung unter Zugabe der noch fehlenden Säure bzw. Lauge hergestellt.

Zur Lösung wurden benutzt:

1.) 1,08 ccm n NaOH (0,01 n NaOH Gesamtkonzentration).

2.) 26,94 ccm 4 n CH_3COOH (1,0 n CH_3COOH Gesamtkonzentration).

Während sich das Caseïn schon bei Zimmertemperatur in 0,01 n NaOH klar mit gelblicher Farbe löst, musste zur Beschleunigung der Lösung des Caseïns in Essigsäure auf dem Wasserbade auf etwa 50^0C angewärmt werden. Die Lösung wird in der Hitze fast klar und trübt sich unter Opalescenz etwas beim Abkühlen.

Bei den optischen Messungen betrug die Caseïnkonzentration höchstens 0,5 Prozent,und die Essigsäurekonzentration war in allen Fällen 0,5 normal. Das Caseïn ist weder in 0,01 n noch in 0,1 n oder 1,0 n Salzsäure löslich, doch verträgt das bereits in Essigsäure gelöste Caseïn ziemliche Mengen von HCl-Zugabe,ohne auszuflocken.Stärkere Trübungen treten erst bei einer HCl-Konzentration > ca 0,2 n auf, sodass auch die rote

Grenzkurve des Methylorange in 0,1 n HCl noch gut zu messen war.

c.) Genuines Hühnereiweiss.

Weil das genuine Hühnereiweiss eine physiologische Mischung mehrerer Proteïne ist, besteht die Gefahr, dass beim Eintreten der Fäulnis die Spaltungsprodukte, die ebenfalls auf den Indikator einwirken können, den Eiweissfehler der noch unzersetzten Proteïne stören. Ebenso kann auch Alterung ohne Fäulnis einen Einfluss auf den Eiweissfehler ausüben. Deshalb wurden nur ganz frischgelegte Hühnereier benutzt, die von einer Hühnerfarm direkt aus den Legenestern geholt und sofort verarbeitet wurden. Tatsächlich konnten einige gut messbare Zeitreaktionen beobachtet werden, und deshalb war ein Aufbewahren der Stammlösungen nicht möglich, wenn die Ergebnisse auch nur einigermassen reproduzierbar sein sollten. Mit Ausnahme der Zeitreaktionsmessungen selbst war zwischen Legen der Eier und Ende der Messung nie mehr als höchstens 36 Stunden verstrichen. Vorversuche hatten ergeben, dass es ratsam ist, nur geschlagenes Eiweiss zu benutzen, da beim Mischen und Umschütteln der verschiedenen Lösungen sich sonst im Schaum ein Teil des Eiweisses absetzt, der sich hinterher nicht mehr klar löst.

Das Eierklar von 5-10 Eiern wurde in einer Porzellanschale zu Schaum geschlagen und die wieder abgesetzte Eiweisslösung unter einer grossen Glasglocke durch ein Faltenfilter filtriert. Zur vorübergehenden Sterilisierung wurde ein kleines Schälchen mit einigen Tropfen Chloroform mit unter die Glocke gestellt. Über Nacht war soviel Filtrat durchgelaufen, um genügend Lösung ansetzen zu können.

Der Gehalt an Gesamteiweiss wurde dadurch bestimmt, dass 2 ccm des Filtrates in einem gewogenen Porzellanschiffchen in einer Trockenpistole mit Heizmantel über P_2O_5 im Vakuum zuerst bei Zimmertemperatur, dann bei 100^0 C (Heizung mit Wasserdampf) getrocknet wurden. Von dem gefundenen Prozentgehalt

des Trockenrückstandes wurden 0,7 %, als auf anorganische Substanz entfallend, abgezogen [1]. Es wurde gefunden bei 3 Messungen:

12,8 % Gesamteiweiss
12,6 % "
12,65% "

Im Mittel 12,7 % Gesamteiweiss.

Da die im genuinen Hühnereiweiss vorkommenden Proteïne in ihrem Verhalten verschiedene Eigenschaften haben, ergaben sich gewisse Schwierigkeiten. Auf Einzelheiten soll erst bei Besprechung der Messungen eingegangen werden.

C.) Messmethoden:

1.) optisch

a.) Apparatur.

Zunächst wurde versucht, mit dem Spektralphotometer nach König-Martens-Grünbaum auszukommen; doch zeigte sich schon bald, dass infolge der Eigenabsorption der Eiweisskörper gerade in dem wichtigen Gebiete von 436-500 mμ nur noch so wenig Licht durch die Lösungen durchtritt, dass die Messgenauigkeit sehr gering wird und etwaige Beeinflussungen des isosbestischen Punktes u.s.w. der Beobachtung entgehen. Deshalb wurden sämtliche Messungen mittels der photoelektrischen Einzellenapparatur nach H.v.H a l b a n [2] ausgeführt. Die Apparatur wurde, abgesehen von einer handlicheren Aufstellung der elektrischen Instrumente so übernommen, wie sie in der Dissertation von G.C o c h [3] beschrieben wurde.

Erwähnt sei nur eine Vorrichtung zum bequemen Austausch der Mess-und Vergleichsröhren. Bei der bisherigen Anordnung waren zwei miteinander gekoppelte Halter auf einer gemeinsamen optischen Bank mit Anschlägen montiert. Beim Hin-und Herschieben

1.) H a m m e r s t e n: loc.cit. S. 489.
2.) H.v. H a l b a n: Z.f.phys.Chem. 96, 233 (1920).
3.) G.C o c h: loc.cit.
ferner L. J u n g f e r: Diss. Marburg 1923
E. V o g t: " 1924
O. P e t e r: " 1927.

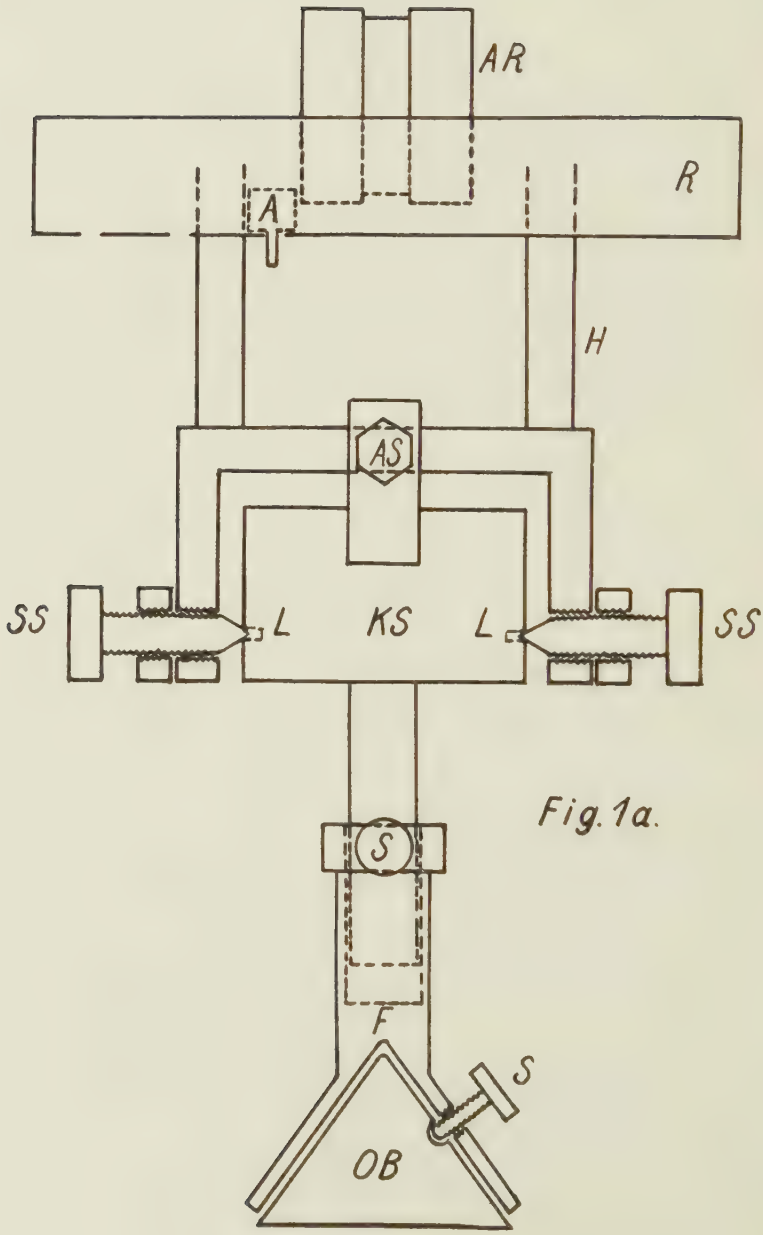


Fig. 1a.

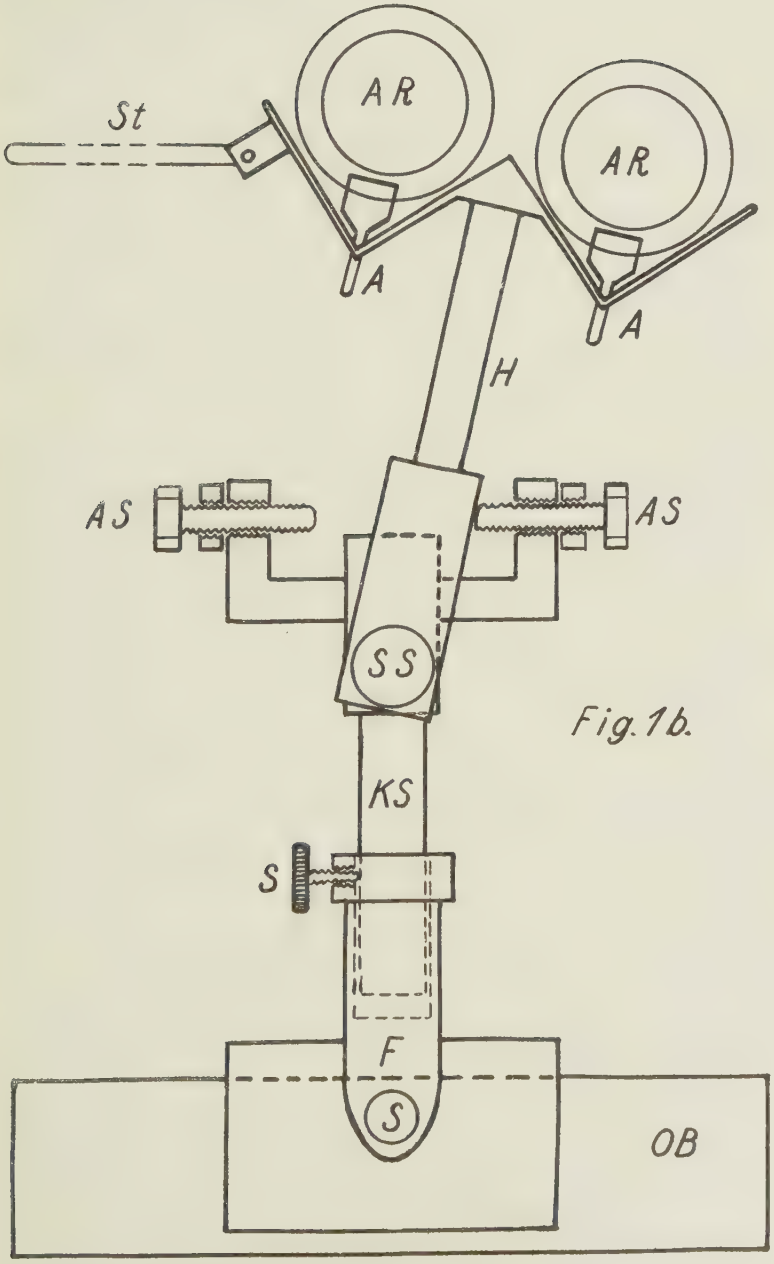


Fig. 1b.

traten wegen der grossen Reibung und dadurch benötigten Kraftanstrengung unter Umständen Erschütterungen und Verschiebungen der optischen Apparatur auf. Sehr gut bewährte sich ein Kipphalter mit Spitzenlagerung (Figur 1 a und b). Der Kipphalter besteht aus drei Teilen, dem Fusse F, der auf der optischen Bank OB befestigt wird, dem Sockel KS und dem eigentlichen Röhrenhalter H. Letzterer ist durch die spitzen Schrauben SS mit dem Sockel verbunden. Diese beiden Schrauben bilden mit den Löchern L die Achse, um die sich der Halter dreht. Der Bügel B mit den Anschlagschrauben AS dient zur Einregulierung des richtigen Ausschlages von H. Die Absorptionsröhren AR liegen in den beiden Rinnen R und werden bis an die zwei auswechselbaren Anschlagstifte A herangeschoben. Die Messingstange St führt aus dem lichtdichten Kasten, in dem die Zelle mit dem Halter steht, ins Freie und dient dazu, die Röhren abwechselnd in den Lichtstrahl einzuschalten.

Damit bei den Messungen mit der Mess- und Vergleichsröhre möglichst gleiche Lichtmengen auf die Zelle fallen und dadurch die Voltmeterausschläge bei Messung der Kompensationsspannung möglichst gleich werden, wurde das Licht, das durch die Vergleichsröhre tritt, durch einen rotierenden Sektor geschwächt, nachdem dessen günstigste Öffnung auf Grund einer orientierenden Messung festgestellt worden war. Zu dem Zwecke wurde der Umschlag in einem günstigen Spektralbezirk roh bestimmt, die zu erwartenden Extinktionen aus den Grenzkurven berechnet und die Sektoröffnung dementsprechend eingestellt.

Die Grundlage für die Spektralphotometrie gibt das L a m b e r t-B e e r'sche Absorptionsgesetz, welches (für monochromatisches Licht) das Verhältnis vom durchtretenden zum einfallenden Licht I/I_0 mit der molaren Konzentration des absorbierenden Stoffes c und der Schichtdicke d in Zusammenhang bringt. Es lautet:

$$I/I_0 = 10^{-\varepsilon.c.d} \quad \text{oder} \quad \varepsilon = \frac{\log I_0/I}{c.d}$$

Die Grösse ε nennt man den molaren Extinktionskoeffizienten.

Messbare Abweichungen vom Beer'schen Gesetz (ungleiche Absorption bei gleichem c.d) deuten darauf hin, dass in den Lösungen durch Reaktionen andere Absorptionsverhältnisse entstanden sind. Wenn auch die Gültigkeit für molekulardisperse Lösungen bei Indikatoren immer bestätigt worden ist, so war hier eine Nachprüfung doch erforderlich, da in kolloidalen Lösungen an der Grenzfläche Kolloid-Lösungsmittel Oberflächenkräfte wirksam sind, die Störungen hervorrufen können. Die Nachprüfung geschah teils an Grenzkurven, teils an Kurven des Umschlagsgebietes (Tab. 2).

Tabelle 1.

a.

(Werte von $\varepsilon \cdot 10^{-2}$ in cm^2 /Mol).

Methylorange in 0,1 n HCl (p_H = 1,04)

Präparat von / λ →	436	450	462	470	478	500	513	527	540	546	560
Dassler	76	-	-	-	349	490	486	450	-	310	124
Coch	76	140	224	-	334	474	479	448	-	312	132
Schulz	73	135	222	276	330	461	467	435	369	311	130

b.

Methylorange in 0,01 n NaOH (p_H = 12)

Dassler	237	-	-	-	275	182	116	59	-	21	6
Coch	233	259	271	-	253	172	114	60	-	20	6
Schulz	229	257	268	265	251	173	117	63	31	21	6

Tabelle 2.

Prüfung des Beer'schen Gesetzes.

Nr.	Eiweisskörper	Elektrolyt	c (mol.)	d (cm)	λ 450	468	513
1	0,2 % Caseïn	0,5 nHAc,0,1n HCl	1.10^{-5}	2	0,137	0,270	0,468
			4.10^{-6}	5	0,135	0,271	0,468
2	0,5 % Caseïn	" "	1.10^{-5}	2	0,138	-	-
		" "	4.10^{-6}	5	0,139	-	-
3	0,5 % Caseïn	" ,0,5nHCl	1.10^{-5}	2	0,203	0,255	0,273
			4.10^{-6}	5	0,204	0,258	0,269
4	2,25% gen. Hühnereiweiss	— 0,01nHCl	1.10^{-5}	2	0,254	0,266	0,121
			4.10^{-6}	5	0,256	0,271	0,123

Tabelle 2 zeigt, dass auch bei Gegenwart von Eiweisskörpern das L a m b e r t-B e e r'sche Gesetz streng gilt. Die Gründe, weshalb die Genauigkeit der Methode bei Gegenwart von Eiweissstoffen kleiner als normal ist, wird noch erläutert werden. Bei allen Messungen wurde dest. Wasser benutzt, das zur Entfernung von Kohlensäure und Staubteilchen ein zweites Mal mit $Ba(OH)_2$ und Tierkohle destilliert worden war.

b.) Schwierigkeiten und Genauigkeit der Methode. Obgleich die photoelektrische Messung von Absorptionskurven die zur Zeit genauste aller Methoden ist, so kann doch in den hier behandelten Fällen ihre Genauigkeit nicht voll ausgenutzt werden. Bei Eiweissstoffen treten nämlich Fehlerquellen auf, die in ihrer kolloidalen Lösungsform, dem amphoteren Charakter und der komplizierten chemischen Zusammensetzung begründet sind und sich in Trübungen, Flockungen und Zeitreaktionen bemerkbar machen. Die Ungenauigkeiten, die dadurch in die Messungen hineinkommen, können die der Methodik beträchtlich übertreffen.

Da die Eiweisslösungen eine Eigenabsorption haben, die hauptsächlich im blauen und violetten Teil des sichtbaren Spektrums liegt, konnten die optischen Messungen nicht wie sonst allgemein üblich gegen eine Wasserröhre mit gleicher Schichtdicke erfolgen, sondern mussten gegen eine Vergleichsröhre mit genau gleicher Eiweiss-und Elektrolytkonzentration vorgenommen werden, um nur die Absorptionskurve des Methylorange selbst zu erhalten. Dabei ergab sich die Hauptschwierigkeit des ganzen Verfahrens, die darin liegt, dass es, besonders bei höheren Eiweisskonzentrationen als ca.0,5%, selbst bei Benutzung der gleichen Eiweissstammlösung und Einhalten der gleichen Bedingungen (z.B.beim Mischen) kaum gelingt, Lösungen mit völlig gleicher Eigenabsorption zu erhalten. So betrug z.B. die Absorption bei 4 Lösungen von 0,4% gen. Hühnereiweiss in 0,5 n HAc, die alle mit der gleichen einprozentigen

Stammlösung angesetzt waren, in 2 cm Schichtdicke bei der Wellenlänge von 513 mμ(gegen Wasser gemessen):

E = 0,013
0,027
0,024
0,015

Im kurzwelligen Teil des Spektrums können die Unterschiede noch viel grösser werden. Da die Absorption des Eiweisses sich wegen dieser Unterschiede in den beiden Absorptionsröhren nicht aufheben kann, und ausserdem in der indikatorhaltigen Lösung nicht messbar ist, können unter Umständen weit grössere Unstimmigkeiten auftreten, als man sonst bei der sehr genau arbeitenden photoelektrischen Methode beobachtet.

Besonders krass zeigt sich das natürlich in der Nähe des isosbestischen Punktes, wo man dann zuweilen Absorptionskurven erhalten kann, die weit ausserhalb des möglichen, von den Grenzkurven bestimmten Umschlagsgebietes zu verlaufen scheinen, obgleich aus den Messungen mit verdünnteren Lösungen hervorgeht, dass nicht der geringste Anlass zu solch einem anormalen Verlaufe besteht.

Ausserdem war es, namentlich bei höherem Eiweissgehalt, schwierig, in der Durchsicht für das Auge klare Lösungen zu erhalten und so grössere Lichtverluste zu vermeiden, die durch Beugung des Lichtes an den kolloiden Teilchen entstehen können. Selbst bei scheinbar klaren Lösungen kann die Absorption im violetten Teile des Spektrums grösser sein als die des Methylorange, wobei durch die Ungenauigkeiten beim Abpipettieren der Lösungen u.s.w. neue Fehlerquellen entstehen. Als Beispiel sei der gemessene und nicht auf molare Konzentration und 1 cm Schichtdicke umgerechnete Extinktionswert (log I_o/I) von 0,5 % Caseïn in 0,5 n HAc bei 436 mμ angegeben, der in einem Falle bei 5 cm Schichtdicke (gegen Wasser gemessen) 0,773 betrug, während der entsprechende

Wert für Methylorange von der üblichen Konzentration (10^{-5} molar) in 0,5 n HAc (ebenfalls gegen Wasser gemessen) nur 0,620 gross ist.

Da, wie eben bemerkt, keine Anzeichen vorliegen, dass die Lage des isosbestischen Punktes in Bezug auf Extinktion oder Wellenlänge verschoben wird, kann man an diesem Punkte (λ = 469 mμ) nachkontrollieren, ob die Eigenabsorption des Eiweiss in Lösung und Vergleichslösung gleich ist, da die sich aus den Durchschnittswerten der Grenzkurven ergebende Extinktion des Methylorange hier in allen Fällen(innerhalb der Versuchsfehler) 0,266 ± 0,002 .10^5) betragen muss. Im allgemeinen begnügte ich mich mit einer Genauigkeit von ± 4 % des Wertes von 0,266.10^5 bei 469 mμ. Nur beim genuinen Hühnereiweiss sind hier die Abweichungen - 7 % und - 9 % in 0,4 bzw. 0,8%iger Lösung (s.Tab.23,Fig.8). Diesen Messfehlern entsprechen natürlich wegen der verschiedenen für die Berechnung von d_r benötigten ($\varepsilon r - \varepsilon g$)-Werten sehr viel grössere Unterschiede in den Umschlagswerten d_{yr} Die Messungen wurden möglichst in 2 cm langen Röhren vorgenommen. Nur bei kleinen Extinktionen benutzte ich solche von 5 cm Schichtdicke. Längere Röhren wurden in keinem Falle benutzt. Wegen der grossen Lichtverluste im violetten Teil des Spektrums (s.o.) wurde nur bis 436 mμ gemessen. In ungünstigen Fällen (Tab.20 und 21) kann die Messung auch bei 436 mμ schon ganz illusorisch werden, namentlich dann, wenn zwischen Eiweisskörper und Lösungsmittel (konz. HCl) eine zeitlich fortschreitende Farbreaktion eintritt.

2.) Die elektrische Messmethode.

a.) Apparatur.

Zur potentiometrischen Messung der Wasserstoffionen- aktivitäten kam die Kompensationsschaltung nach P o g g e n - d o r f f zur Anwendung(Schaltskizze Fig.2).Als Gefällsdraht dienten zwei Präzisionsrheostaten(Rh) von je 11111 Ohm. Die Stromlosigkeit im Nebenstromkreis wurde mit einem Spiegelgal-

vanometer G

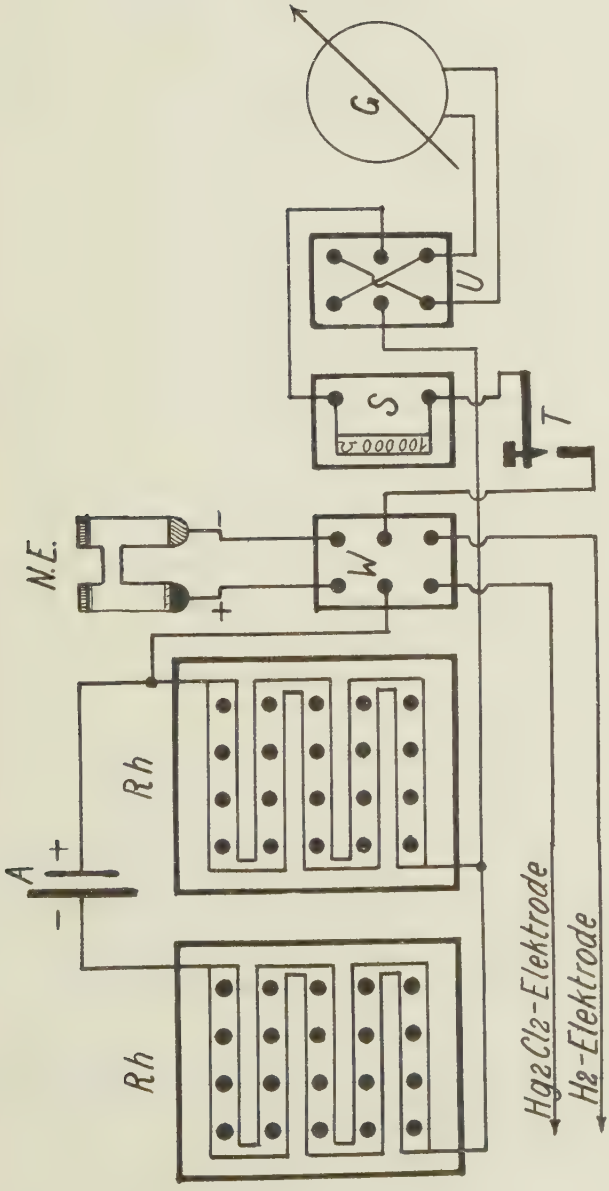


Fig. 2 (Schaltskizze)

mit Fadenaufhängung (Empfindlichkeit ca 10^{-8} Amp.) beobachtet. Bei gutleitenden Lösungen betrug die Empfindlichkeit ungefähr 0,03 und bei schlechtleitenden ca 0,1Millivolt. Um bei letzteren den Ausschlag des Galvanometers verdoppeln zu können, war ein Stromwender U eingebaut. Der Messakkumulator A hatte eine Kapazität von 36 Ampèrestunden. Als Normalelement diente ein selbsthergestelltes Westonelement, das von Zeit zu Zeit mit einem zweiten (s.Fig.3, N E), das mit Ausgangsmaterialien anderer Herkunft hergestellt war, nachkontrolliert wurde. Der Unterschied betrug nur selten mehr als 0,05 Millivolt.

Als Messelektroden wurden Chinhydron-und vor allen Dingen Wasserstoffelektroden benutzt. Die Bezugselektrode war eine 1/1 n Kalomelelektrode. Das Diffusionspotential wurde nach N. B j e r r u m [1] durch Zwischenschaltung von 1,75 n und 3,5 n KCl-Lösungen eliminiert, wobei die ganze Differenz über den mit der 3,5 n KCl-Lösung gemessenen Wert hinaus extrapoliert wurde. Die Ableitungen der Elektroden tauchten in kleine Bechergläschen mit der gleichen Lösung wie in den entsprechenden Elektroden. Die Verbindung geschah durch hineingestellte kleine Heber mit 1,75 n bzw. 3,5 n KCl-Lösung. Die Schaltung der Kette war also:

−					
Pt , H_2	Lösung unbekannter aH·	KClLösung 1,75 n und 3,5 n	1/1 KCl $H_{g2}Cl_2$ges.	Hg	+

Um das Auslaufen der spezifisch schweren KCl-Lösungen zu verhindern, waren die Enden der Heber nach oben gebogen und mit Wattestopfen verschlossen. Dadurch waren die Diffusionspotentiale gut reduzierbar, besonders dann, wenn sie nicht mehr als ca 0,5 Millivolt betrugen. Die Versuchstemperatur war stets 18,0 C^0.

Von S ö r e n s e n [2] war der Wert der 0,1 n Kalomelelektrode gegen eine Normalwasserstoffelektrode zu 0,3377 Volt

1) Z.f.phys.Ch. 53, 428 (1905)

2) S.P.L. S ö r e n s e n: loc.cit.S.155.

(18^0C)bestimmt worden. Da hier dagegen mit einer 1,0 n Kalomelelektrode gemessen wurde und in der Literatur verschiedene Potentialdifferenzen zwischen diesen beiden Elektroden angegeben sind, wurde das Normalpotential der benutzten 1,0 n Kalomelelektrode neu bestimmt. Die direkte Messung gegen eine Normalwasserstoffelektrode (2 n H_2SO_4), deren Stufe als Bezugswert mit 0,00 angesetzt wird, ist wegen des grossen Diffusionspotentials zu ungenau. Die Bestimmung erfolgte deshalb auf indirektem Wege durch Messung der beiden gegeneinander geschalteten 1,0 n und 0,1 n Kalomelelektroden, wobei eine Potentialdifferenz von 0,0516 Volt (18^0 C) gemessen wurde in genauer Übereinstimmung mit dem von M i s l o w i t z e r [1] angegebenen Werte. Daraus errechnet sich das Normalpotential der 1,0 n Kalomelelektrode zu:

+ 0,3377 - 0,0516 Volt = + 0,2861 Volt (18^0C).

Der Wasserstoff wurde an Nickelnetzen elektrolytisch aus einer 25%igen Kalilauge entwickelt. Zur Reinigung strömte er der Reihe nach durch eine Waschflasche mit Glasrohrspirale, gefüllt mit alkalischer Pyrogallösung, und dann eine Waschflasche mit dest. Wasser, ferner durch ein Wattefilter und zum Schluss durch ein elektrisch geheiztes Rohr mit Palladiumasbest, um die letzten Spuren von Sauerstoff zu entfernen.

Die N e r n s t'sche Formel gilt streng genommen nur für Wasserstoff unter Normalbedingungen. Deshalb wurden wegen des schwankenden Luftdruckes Korrekturen angebracht. Der in der Elektrode herrschende Druck setzt sich zusammen aus dem Partialdruck des Wasserstoffs und dem Partialdampfdruck der zu untersuchenden Lösung. Deshalb müsste der Wasserstoff eigentlich zuerst durch eine Waschflasche mit der Untersuchungslösung (bei gleicher Temperatur) geleitet werden, damit er sich hier mit Wasserdampf sättigen kann. Auf diese Vorsichtsmassnahme konnte jedoch verzichtet werden; denn erstens

---

1) E. M i s l o w i t z e r: Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration von Flüssigkeiten, 1928, S.167.

ist die Sättigung wegen der nur kurzen Berührung von Wasserstoff und Lösung meist doch nur unvollkommen, zweitens ist bei der Messtemperatur von 18°C der Dampfdruckunterschied zwischen Wasser und verdünnten Lösungen meist so gering, dass er vollkommen vernachlässigt werden kann[1] und drittens ist der elektrolytisch entwickelte und in den verschiedenen Waschflaschen gereinigte Wasserstoff bereits weitgehend mit Wasserdampf gesättigt.

Die Barometer-Korrekturen E_{bar} betragen bei Lösungen von 18°C:

Tabelle 3.

Barometerkorrektur der H_2-Elektrode (18°C)

Auf 0° C korrigierter Barometerdruck	Korrektur Millivolt
731 - 737	+ 0,7
737 - 743	+ 0,6
743 - 749	+ 0,5
749 - 755	+ 0,4
755 - 761	+ 0,3
761 - 767	+ 0,2
767 - 774	+ 0,1
774 - 781	± 0,0
781 - 787	- 0,1

Die Formel zur Berechnung der Stufen lautet dann für 18°C

$$p_H = \frac{E_{gem} + E_{bar} - 0,2861}{0,0577_2}.$$

Der Kalomelelektrode wird nachgesagt, dass ihr Potential gewissen unkontrollierbaren Schwankungen ausgesetzt ist, und deshalb wird häufig als Bezugselektrode eine Wasserstoff-oder Chinhydronelektrode mit einer " Standardlösung" (meist 0,1 n Na-acetat mit 0,1 n Essigsäure oder 0,01 n HCl mit 0,09 n KCl) empfohlen. Der Grund dürfte darin liegen, dass sich das Potential der Wasserstoffelektrode für eine bestimmte Temperatur

---

1) z.B. beträgt der Dampfdruckunterschied zwischen Wasser und 7%iger NaOH-Lösung bei 18°C nur 1,3 mm Hg.

schneller einstellt als das der Kalomelelektrode. Selbst bei Kenntnis des Temperaturkoeffizienten würde man dann bei der Kalomelelektrode falsche Werte erhalten. Um vor dieser Unsicherheit der langsamen Potentialeinstellung, die in ungünstigen Fällen mehrere Millivolt betragen kann, unabhängig zu sein, wurden die Elektroden in Thermostaten gesetzt, deren Konstruktion aus Fig.3 hervorgeht (siehe Einschlag am Ende des Heftes).

Erläuterungen zu Fig.3.

Die verschiedenen Elektroden und Reguliervorrichtungen befanden sich in zwei Woulff'schen Flaschen mit sieben bzw. fünf im Kreise angeordneten Tuben, von denen einer für die Wasserstoffelektrode versenkt war. Zur besseren Übersicht sind die Flaschen an der Seite aufgeschnitten und aufgerollt gezeichnet. (ca 1/3 nat.Grösse.) Es bedeuten:

HL Heizlampe: PE Platineinschmelzung aus 0,6 mm Platindraht für die Stromzuführung, Hd Heizdraht aus 0,1 mm Platindraht ca 20 cm lang. Stromverbrauch 25-35 Watt.

RV Rührvorrichtung: Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde bei P dauernd Luft angesaugt, die durch L am Boden der Flasche zusammen mit dem Kühlwasser KW (bei Aussentemperaturen über 18^0C) eintritt.

T geeichtes Thermometer in $0,1^0$ C geteilt.

TR Thermoregulator mit Xylol und Quecksilber gefüllt: V Verschluss aus eingekittetem Hartgummistück und Schraube aus V2A-Stahl, RS Regulierschraube.

U Elektrischer Unterbrecher nach T h i e l und B a a r s [1]. Dichtungen und Isolierungen schraffiert gezeichnet.

H_2 El Wasserstoffelektrode: H_2 E Wasserstoffeintritt. Beim Ausspülen und Füllen der Elektrode wurde die Verbindung mit dem Wasserstoffentwickler bei H_2 E gelöst. Bei stark schäumenden Lösungen trat der Wasserstoff zuerst bei H_2A_1 aus, bis aus der

---

1) E. B a a r s, Diss.Marburg 1925.

Zuleitung alle Luft vertrieben war. Dann wurde der Wasserstoff durch die Elektrode geleitet und trat bei H_2A_2 wieder aus. Vorlage war ein mit Wasser gefülltes angehängtes Bechergläschen.

B_1 Bechergläschen mit der zu messenden Lösung.

B_2 Bechergläschen mit n KCl-Lösung.

H Heber mit 1,75 n bzw. 3,5 n KCl-Lösung.

Kal El 1/1 n Kalomelelektrode:BF Blasenfänger; VL Tropftrichter mit 1/1 n KCL-Lösung zum Durchspülen; VF Verschlussfläschchen für Nichtgebrauch; Hg Quecksilber; Pa Paste aus Quecksilber und Kalomel.

NE Normalelement in Röhrenform:Hg Quecksilber; Pa Paste aus Quecksilber und Merkurosulfat; Cd Cadmium-Amalgam.

Ch-El Chinhydron-Elektrode.

St Stopfen gegen Ch El austauschbar.

Mi-El Mikroelektrode, die gegen die Chinhydron-Elektrode austauschbar ist. G in das angesetzte Rohr eingesetztes Gestell zur Aufnahme der zu messenden Lösung, H Heber mit Agar-Agar und der Messlösung gefüllt. H_2 E Wasserstoffeintritt, H_2 A Wasserstoffaustritt.

Die Temperaturregulierung erfolgte ununterbrochen auch bei Nichtgebrauch.Die Regulatoren arbeiteten auf etwa 0,01°C genau. Während der Potentialmessung musste der Heizstrom abgestellt werden, da das Galvanometer sonst beim Öffnen und Schliessen des Heizstromes infolge von Induktionsströmen ausschlug.

Die Kalomelelektrode wurde von Zeit zu Zeit mit einer genau eingestellten Standardacetatlösung kontrolliert. Tatsächlich zeigte sich, dass die so auf konstanter Temperatur gehaltenen Elektroden stets die gleichen p_H-Werte von 4,616 $\pm$ 0,002 ergaben. Bei gut gepufferten Lösungen war die Reproduzierbarkeit etwa $\pm$ 0,15 Millivolt.

Die Wasserstoffelektrode wurde mit der zu messenden Lösung soweit gefüllt,dass nur noch ein kleiner Luftraum vorhanden war.

Das hat den Vorteil, dass sich wegen der schnelleren Verdrängung einer nur kleinen Luftmenge die Zeit des Einleitens stark abkürzen lässt. Erst gegen Schluss wurde die Lösung mit Wasserstoff aus der Elektrode soweit herausgedrückt, dass der Platindraht nur noch 1-2 mm eintauchte. Auch vermeidet man so die Gefahr, dass aus der im Ableitungsrohr befindlichen Lösung Sauerstoff zurückdiffundiert, da dann auch hier die Lösung mit Wasserstoff gesättigt ist. Bei gewöhnlichen Stufenlösungen genügte im allgemeinen ein Einleiten von 10-15 Minuten. Bei stark schäumenden Eiweisslösungen wurde nur sehr langsam und entsprechend länger eingeleitet(2-3 Stunden).

b.) Mit Kollodium geschützte Wasserstoffelektrode. [1]

Es gibt mehrere Fälle, bei denen die potentiometrische Stufenmessung mit Hilfe der Wasserstoffelektrode versagt. Man erhält dann falsche Werte, deren Betrag häufig von der Zeit abhängig erscheint. Das tritt z.B. ein, wenn einer der gelösten Stoffe mit dem am Platin aktivierten Wasserstoff reagiert, und ferner, wenn in der Lösung kolloidal oder echt gelöste Potentialgifte vorhanden sind. Ausserdem können beide Erscheinungen gleichzeitig auftreten, wenn nämlich bei der Reduktion einer an sich ungiftigen Lösung Potentialgifte entstehen. Dieser letzte Fall liegt häufig bei Eiweisslösungen, besonders in saurer Lösung, vor.

So fand z.B. S.P.L.S ö r e n s e n [2], dass eine salzsaure Lösung von gen. Hühnereiweiss, deren Stufe colorimetrisch zu 2,58 gefunden worden war, bei der potentiometrischen Messung Werte ergab, die von 1,80 (nach halbstündigem Durchleiten von Wasserstoff gemessen)nach 25stündigem Einleiten bis ungefähr 0,7 abfielen. Als Ursache konnte die Bildung eines Potentialgiftes an der Elektrode, nämlich Schwefelwasserstoff, nachge-

---

1)Der Inhalt dieses Abschnittes wurde zum grössten Teil bereits veröffentlicht.
A. T h i e l und G. S c h u l z, Z.f.Elektrochemie 36, 409 (1930)

2)S.P.L. S ö r e n s e n, loc cit. S.199.

wiesen werden. Nach Reinigung der Elektrode steigt der Wert zunächst wieder auf 2,29, um aber nach kurzer Zeit wieder abzufallen. Einen Ausweg bietet häufig die Chinhydronelektrode, mit der man unter Umständen auch in Gegenwart von Potentialgiften richtige Werte erhält und deren Wasserstoffdruck so gering ist (ca. 10^{-24} Atmosph.), dass Reduktionen praktisch ausgeschlossen sind. Andrerseits ist die Chinhydronelektrode in Gegenwart von Eiweisskörpern häufig unbrauchbar, da zwischen Chinhydron und Eiweiss Reaktionen eintreten können, die sich schon äusserlich durch das Auftreten einer Rotfärbung erkennen lassen. K o l t h o f f und andere [1] geben zwar an, dass bei Stufen kleiner als 8,0 der Eiweissfehler der Chinhydronelektrode, verglichen mit dem der Platinwasserstoffelektrode, praktisch nicht vorhanden ist; doch wurden bei meinen Messungen mit anderen Elektrodenanordnungen so abweichende Stufen gefunden, dass auch Werte mit dieser guten Übereinstimmung als unsicher erscheinen müssen (s.w.u). Ausserdem hat die Chinhydronelektrode den grossen Nachteil, dass sie bei Messungen von alkalischen Stufen ($p_H > 8,0$) vollkommen versagt.

Neuerdings haben A. I. R a b i n o w i t s c h und V.A.K a r g i n [2] die Vergiftung der Platinwasserstoffelektroden durch kolloidales Arsentrisulfid beobachtet und daher ihre Untersuchung über den Koagulationsvorgang mit Glaskugelelektroden ausgeführt.

Bei Stufenmessungen von Caseinlösungen, die Salzsäure und Essigsäure enthielten, wurden gleichartige Erfahrungen gemacht, wenn auch die Abweichung in diesem Falle bei weitem nicht so gross ist wie in der Versuchsreihe von S ö r e n s e n.

1) K o l t h o f f, Z.f.physiol.Chemie 144, 259, (1925) ferner L i n d e r s t r ö m-L a n g, Cpt.rend.du Lab. Carlsberg 16 Nr.3, 1 (1925). R e i m e r s, Ztschr.d.ges.exper.Med. 67, 327 (1925).

2) Ztschr. physik.Chem. A. 143, 21 (1929).

Trotzdem ist der zeitliche Gang der Stufenwerte deutlich zu erkennen (Tabelle 4).

Tab.4.

0,5% Caseïn in 0,5 n HAc 0,01 n HCl.

Dauer des Einleitens (Std.)	p_H
½	1,987
24	1,901
72	1,783
73	2,021
96	1,991

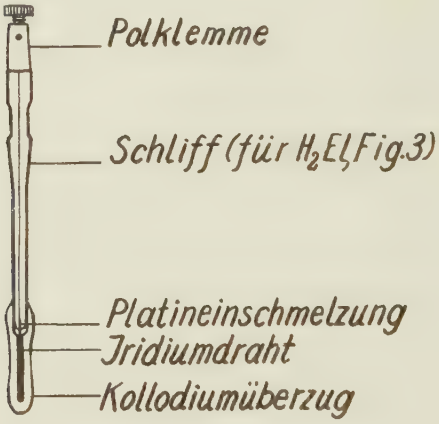
Nach 72 Stunden wurde der Versuch unterbrochen und die Elektrode mit Bichromat-Schwefelsäure und dann mit Wasser ausgekocht. Genau wie in dem von S ö r e n s e n mitgeteilten Falle stieg das Potential wieder an (p_H 2,021),um nach einiger Zeit wieder abzunehmen. Überhaupt scheint die Reduktion von der Stufe und der zugesetzten Säure abhängig zu sein, denn Caseïn sowie gen. Hühnereiweiss ergaben in essigsaurer Lösung (also ohne Salzsäurezusatz) konstante Werte, die sehr nahe bei den mit Chinhydron gemessenen lagen (abgesehen von einem noch zu besprechenden Schaumeffekt).

Es wurde nun versucht, die Vergiftung dadurch zu verhüten, dass die Berührung zwischen Elektrode und Eiweiss verhindert wird. Das lässt sich z.B. durch Ultrafiltration und Messen des ungiftigen Filtrates ausführen. Dies Verfahren ist jedoch sehr umständlich und lässt sich nicht durchführen, wenn man fortlaufende Stufenänderungen messend verfolgen will.

Sehr viel einfacher kommt man aber zum Ziel, wenn man die Elektrode selbst mit einer ultrafiltrierenden Schutzschicht umgibt, die den Zutritt des Kolloids zur Elektrode verhindert, dagegen die dauernde Berührung mit der molekulardispersen Lösung gestattet.

Die in Glas eingeschmolzenen Platinelektroden taucht man zu diesem Zwecke in eine Lösung von Eisessig-Kollodium und flockt das Kollodium durch Einbringen in Wasser auf der Elektrode aus (Fig.4.).

Fig. 4.



Der Kollodiumgehalt hat sich nach der Teilchengrösse des Kolloids zu richten. In den hier behandelten Fällen hat sich eine 8%ige Lösung als brauchbar erwiesen, die aus der 10%igen Ultrafilterlösung nach B e c h h o l d-K ö n i g durch Verdünnen mit Eisessig hergestellt wird. Durch gründliches Waschen in mehrfach gewechseltem dest.Wasser, dann in stark verdünnter Natronlauge (um die letzten Spuren der hartnäckig an der Elektrodenoberfläche haften bleibenden Essigsäure zu entfernen), zuletzt wieder mit Wasser, wird das Kollodium gereinigt, worauf die Elektrode zum Gebrauch fertig ist. Bei schlecht gepufferten Lösungen wäscht man am besten die Elektrode vor der Messung noch einige Zeit mit der zu messenden Lösung, um einer Verdünnung vorzubeugen. Damit sich nicht zwischen dem Filter und Metall Luftblasen bilden, welche die Potentialeinstellung verzögern können, empfiehlt es sich, Ultrafilterlösung und

Waschflüssigkeit in ausgekochtem und luftfreiem Zustande zu verwenden.

Am sichersten gelingt der Überzug auf folgende Weise:Der gut ausgeglühte Platindraht wird nur kurz platiniert,um grössere Hohlräume zu vermeiden, dann eine halbe Stunde der Elektrolyse in verd. Schwefelsäure unterworfen und darauf zweimal in dest.Wasser ausgekocht. Das erstemal nimmt man etwa 100ccm das zweitemal möglichst wenig Wasser. Man lässt nun die Elektrode in eingetauchtem Zustande mit dem Waschwasser zusammen abkühlen. Das ist wichtig, weil der sonst noch heisse Platindraht an der Luft sofort trocknet und bei der weiteren Behandlung sich dann Luft an der rauhen Oberfläche festsetzen würde. Vor dem Eintauchen in das Eisessigkollodium befeuchtet man die Elektrode zur besseren Benetzung zuerst mit Alkohol und dann mit Eisessig. Den überschüssigen Teil des Kollodiums lässt man unter dauerndem Drehen abtropfen und flockt dann schnell in Wasser aus, worauf das Waschen beginnt. Das Auswaschen selbst dauert normalerweise ca.24 Stunden. Die Einstellung auf das Elektrolytgleichgewicht ist innerhalb von 3 Stunden mit Sicherheit erreicht. Will man Elektrode oder Überzug erneuern, so zerstört man die Filterhaut durch Erhitzen in Bichromat-Schwefelsäure.

Als Elektrodenmaterial verdient mattiertes Iridium (viereckiger gewalzter Draht von 0,6 mm Stärke) vor dem üblichen platinierten Platin den Vorzug, weil sich die Potentiale daran schneller und zuverlässiger einstellen. Man rauht das blanke Iridium durch elektrolytische Behandlung auf, indem man es in ca 20%iger Schwefelsäure als Kathode für einige Stunden der Elektrolyse bei hoher Stromdichte unterwirft.

Während des Durchleitens des Wasserstoffs muss die Elektrode in die zu messende Flüssigkeit vollständig eintauchen, damit der Elektrolyt sich im ganzen Filter gleichmässig verteilen kann. Im übrigen werden die geschützten Elektroden genau wie die ungeschützten benutzt.

Ihre Brauchbarkeit wurde zunächst durch Vergleichung mit gewöhnlichen Elektroden in verschiedenen Stufenlösungen geprüft (Tab.5).

Tab. 5 .

Lösung	p_H gem. mit normaler El.	mit geschützt.El.
ca 0,1 n HCl	1,000	0,989
Standardacetat	4,615	4,612
Citrat-Salzsäure	4,992	4,996
Borax-Salzsäure	8,624	8,623
ca 0,01 n NaOH	11,996	11,982

Die Übereinstimmung ist zwischen den Stufen 4 und 8 als ausgezeichnet zu bezeichnen und in den stärker sauren und alkalischen Lösungen so gut, wie sie angesichts der Unsicherheit bei der Eliminierung des Diffusionspotentials erwartet werden kann.

Sodann wurde die Konstanz der Potentialeinstellung von geschützten Elektroden in caseïnhaltigen Lösungen geprüft. Die Lösung war an Salzsäure ca 0,01 und an Essigsäure 0,5 normal. Der Caseïngehalt betrug 0,5 %. Die in Tab. 6 angegebenen Werte der einzelnen Lösungen unterscheiden sich um einen geringen Betrag (ebenso der Lösungen in Tab. 7), der durch unvermeidliche Titrierfehler verursacht wird.

Tab. 6.

Dauer des Einleitens von H_2 (Stunden)	p_H
3	2,034
7	2,036
27	2,039
1	1,983
18	1,988
42	1,985

Die Konstanz der Einstellung ist also sehr gut. Schliesslich wurde festgestellt, dass mit Kollodium geschützte Elektroden in Gegenwart von Eiweiss Stufenwerte lieferten, die mit den mit Hilfe der Chinhydronelektroden gemessenen befriedigend übereinstimmen. Tab.7 bringt 2 Beispiele für die bei endgültiger Einstellung gemessenen Stufe.

Tab. 7.

Lösung	p_H	
	gesch. El.	Chinhydr. El
0,5 % Casein in 0,01 n HCl, 0,5 n HAc.	2,140	2,171
	2,100	2,085

Vor Anwendung der geschützten Elektroden muss man sich zuerst durch Ultrafiltration der betreffenden Kolloidlösungen durch ein Filter, das mit der gleichkonzentrierten Eisessig-Kollodiumlösung hergestellt wird, überzeugen, ob auch tatsächlich das Kolloid quantitativ zurückgehalten wird. So konnte z. B. festgestellt werden, dass das Witte Pepton (0,2 % in 0,5 n HAc) so hochdispers ist, dass es von einem Filter aus 8 %igem Kollodium vollständig durchgelassen wird. In solchen Fällen muss man die Filter mit Kollodiumlösungen höherer Konzentration herstellen.

Mehrere Versuche, das Lösungsmittel der Schiessbaumwolle, den Eisessig, durch andere nicht ionogene Lösungsmittel, wie Alkohol, Aether oder Aceton zu ersetzen, um das Auswaschen abzukürzen, scheiterten, weil dann das ausgeflockte Kollodium im Wasser unregelmässig schrumpft und eventuelle Risse nicht zu erkennen sind. Möglicherweise misslangen die Versuche auch durch ungünstige Beschaffenheit der von mir selbst hergestellten Schiessbaumwolle.

c.) Ein neuer potentiometrisch messbarer Effekt.

Während der Untersuchungen erschien eine Arbeit von H. P a l l m a n n[1]), die den Nachweis bringt, dass die

1) H.P a l l m a n n: Kolloidchem. Beihefte 30, 334 (1930).

disperse Phase durch Adsorption von Wasserstoffionen (in saurer Lösung) bei der Bildung des Potentials mitbeteiligt ist. In ihrer Gegenwart erhält man also p_H-Werte, die kleiner (also saurer) sind als die des entsprechenden Ultrafiltrates. Diese Erscheinung hat natürlich nichts mit den oben beschriebenen Vergiftungserscheinungen zu tun.

Die in Tab.7 mitgeteilte gute Übereinstimmung zwischen der geschützten Wasserstoff-und der Chinhydronelektrode steht zunächst in direktem Gegensatz zu den von P a l l m a n n angestellten Untersuchungen. Nach P a l l m a n n sollte man erwarten, dass man bei den geschützten Elektroden höhere p_H-Werte erhält als mit der Chinhydronelektrode, da ja das Kollodium nur die molekulardisperse Phase, also das Ultrafiltrat, zur Elektrode gelangen lässt. Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurde bei der Reihe der Hühnereiweisslösungen die Stufe auf 4 verschiedene Arten geprüft und zwar:

1.) mit der gewöhnlichen Pt/ H_2-Elektrode,

2.) mit der Chinhydronelektrode,

3.) mit der geschützten Pt/H_2-Elektrode.

4.) das Ultrafiltrat mit der Pt/H_2-Elektrode.

Von diesen 4 Elektroden müssten nach P a l l m a n n einerseits Nr.1 und 2, andrerseits Nr.3 und 4 identische Werte liefern und zwar müssten die beiden ersten kleiner sein als die beiden letzten. Die Tab.8a zeigt, dass dieser Effekt tatsächlich vorhanden zu sein scheint, aber erst bei höheren Eiweisskonzentrationen deutlich hervortritt.

Tab. 8 a.

Hühnereiweiss in 0,5 n HAc.

Elektrode	Konzentr.des Hühnereiweiss in %. 0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
Pt/H_2	2,483	2,524	2,568	2,649	2,706
Chinhydron	2,476	2,512	2,569	2,661	2,706
gesch.El.	2,493	2,526	2,583	2,691	2,893
Ultrafiltrat	2,491	2,524	2,590	2,703	2,871

Die gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von P a l l m a n n ist jedoch nur scheinbar; denn bei der p_H-Messung der 0,8%igen Eiweisslösung mit der Pt/H_2-Elektrode trat ein Effekt auf, der zwar auch bei den anderen Lösungen schon beobachtet wurde, aber wegen seiner Kleinheit zuerst unberücksichtigt blieb.

Wie bereits erwähnt, kann das Chinhydron bei Gegenwartvon Eiweisskörpern unter Umständen versagen; doch scheint es bisher nicht aufgefallen zu sein, dass man auch im sauren Stufengebiet falsche Werte erhalten kann. Zunächst scheint ja auch, wenn möglichst schnell gemessen wird, in Tab. 8 a die gute Übereinstimmung mit der Pt/H_2-Elektrode dafür zu sprechen, dass die gemessenen Werte von 2,706(0,8%ige Lösung) die richtigen sind. Das Potential beider Elektroden steigt aber mit der Zeit an. Die Änderung der Chinhydronelektrode ist nicht weiter verwunderlich, da sich eine Reaktion durch die bekannte Rotfärbung der Lösung kundtut.

Die Zunahme des Potentials der Pt/H_2-Elektrode ist offenbar mit der Schaumbildung verknüpft, die beim Durchperlen des Wasserstoffs entsteht. Zuerst ist die Elektrode vollkommen vom Schaum umgeben, und in dem Maße, wie die Schaumblasen durch Platzen abnehmen, steigt das Potential an (Tab. 8 b). Um eine eigentliche Stufenänderung handelt es sich nicht; denn wenn man von neuem Wasserstoff einleitet und dadurch den Schaum wieder vermehrt, wird der Wert wieder kleiner. Auch ist eine Vergiftungserscheinung ausgeschlossen, weil in solchen Fällen das Potential stets kleiner wird.

Wenn die Elektrode ganz in die Lösung eintauchte, war die Stufe so tief, dass ein Unterschied gegenüber dem Werte der geschützten Elektrode oder des Ultrafiltrates nicht mehr bestand.

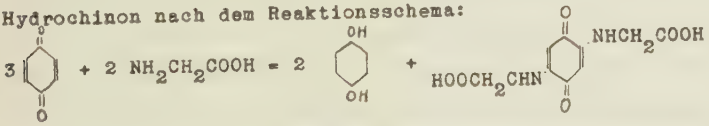
Tab. 8 b.

0,8 % gen.Hühnereiweiss in 0,5 n HAc mit verschiedenen Elektroden gemessen.

Nr	Elektrode	p_H	Bemerkungen
			Frische Lösung
1a	Pt/H_2	2,706	Draht 2 mm eingetaucht, Bl.volle Blasen, möglichst schnell gem. r
b	"	2,819	nach 2Std.,noch einige Bl.vorh.
2a	"	2,879	Draht ganz einget.,sofort gem.
b	"	2,919	nach 1Std.
3a	Chinhydron	2,706	sofort gemessen.
b	"	2,824	nach 1Std. 30 Min.
4a	Pt/H_2, 8% Kollodium	2,893	Draht ganz eingetaucht
b	" "	2,905	" 2 mm "
5	Pt/H_2, Ultrafiltrat	2,871	
			Lösung 11 Tage alt
6a	Pt/H_2, 8% Kollodium	2,860	Draht 2 mm einget.voller Blasen.
b	" "	2,860	" " " , 1Std.gestanden, noch einige Blasen.
7a	Pt/H_2	2,704	2 mm einget.voller Blasen.
b	"	2,789	2 mm einget.,30 Min.gest.noch einge Blasen
8	Pt/H_2 , Mikroelektr.	2,954	
9	" "	2,942	
10	" "	2,964	
			Lösung 3 Wochen alt
11a	Chinhydron	2,704	sofort gemessen.
b	"	2,798	nach 1Std.
12a	Hydro-Chinhydron	2,703	sofort gemessen.
b	" "	2,798	nach1 Std.
13a	Chinon-Chinhydron	2,987	sofort gemessen
b	" "	3,018	nach 1Std.
c	" "	3,205	nach 3 Tagen.

Um jede, auch die geringste mit dem Auge nicht mehr wahrnehmbare Schaumbildung zu vermeiden, wurde die Messung mit einer Mikroelektrode wiederholt, die im Prinzip von R a d s i m o w s k a[1] und L e h m a n n[2] angegeben wurde und bei der nur wenige Tropfen benutzt werden. Die Sättigung mit Wasserstoff erfolgt von oben her. Überraschenderweise liegt der Wert noch unter dem mit der geschützten Elektrode und mit dem Ultrafiltrate gemessenen. Nunmehr wurde die Lösung zu verschiedenen Zeiten mit den verschiedensten Elektroden gemessen (Tab.8 b).

Bei den Messungen mit Chinhydron ist zunächst die Richtung der Stufenänderung auffallend (Nr.3 und 11 in Tab.8 b). Nach den Untersuchungen von C o o p e r und N i c h o l a s[3] entsteht bei der Reaktion zwischen Chinhydron und Eiweiss Hydrochinon nach dem Reaktionsschema:



Damit müsste sich das Potential dem der Hydro-Chinhydron-Elektrode nähern. Wegen des kleineren Normalpotentials ε_h dieser Elektrode müsste also die Wasserstoffionenaktivität scheinbar zunehmen, während sie in Wirklichkeit abnimmt. Eigentümlich ist ferner, dass die Anfangsstufe der Hydrochinon-Chinhydronelektrode (Nr.12a) mit der der Chinhydronelektrode (Nr.3 und 11) identisch ist, während bei Chinonüberschuss der alkalischste Wert (Nr.13) gefunden wird, der etwa dem der Mikroelektrode entspricht (Nr.8,9 und 10).

Welcher der vielen Werte nun der richtige ist, lässt sich ohne weiteres nicht entscheiden. Dazu müsste das Material erweitert und die Messungen vor allen Dingen an gut gepufferten Lösungen vorgenommen werden. Soviel scheint jedenfalls bisher festzustehen, dass der Wert von 2,706 nicht der richtige ist und wahrscheinlich tiefer, bei etwa 2,9, liegen muss.

---

1) R a d s i m o w s k a: Biochem.Ztschr. 154,49 (1924).
2) L e h m a n n: " " 138,213(1923).
3) Journ.of Soc.chem.Ind.46,59 (1927), Zitat C.B.1927.I 2203.

Der auf Schaumbildung beruhende Effekt ist bisher noch nicht beobachtet worden; wenigstens liess sich in den überaus zahlreichen Literaturangaben nichts dergleichen nachweisen. Bekannt war bisher nur, dass in dünnen Schaumhäutchen durch kapillaraktive Stoffe Konzentrationsverschiebungen stattfinden können. So konnte z.B. in verdünnten Lösungen des Amylalkohols von C. B e n s o n [1] im Schaum eine Anreicherung des Alkohols von 0,0375 mol. auf 0,0394 mol. nachgewiesen werden. Dass sich Essigsäure in Schäumen anreichern kann, wurde bereits von v. Z a w i d s k i [2] in Essigsäure-Saponinlösungen titrimetrisch festgestellt. Die Adsorption war allerdings gering. Bei Verbindungen, die Wasserstoffionen bilden, lassen sich demnach Konzentrationsänderungen bei Schaumbildung durch Stufenmessungen verfolgen. In diesem Fall der 0,8%igen Hühnereiweisslösung in 0,5 n HAc ist die Zunahme der Wasserstoffionenaktivität ausserordentlich hoch, steigt sie doch von $c_H = 1{,}12 \cdot 10^{-3}$ norm. (Stufe 2,95 als Mittelwert der Messungen mit der Mikroelektrode) auf $c_H = 1{,}95 \cdot 10^{-3}$ norm. (Stufe 2,71 als sauerster Wert), also auf fast das Doppelte an.

D.) Messergebnisse (Tabellen und Kurven).

In den folgenden Tabellen wurde für die Berechnung der Mittelwerte von α_r (Mol-Bruch der roten Form des Methylorange) verschiedene " Gewichte " eingeführt, derart, dass für Werte von $\varepsilon_r - \varepsilon_g > 0{,}100$ volles und für Werte $< 0{,}100$ nur halbes oder garkein Gewicht angesetzt wurde. Der Umschlagsgrad α_r wurde nach der Formel berechnet:

$$\alpha_r = \frac{\varepsilon_x - \varepsilon_g}{\varepsilon_r - \varepsilon_g}$$

Wo ε_r, ε_g und ε_x die Extinktionen der sauren und gelben Grenzformen sowie der gemessenen Lösung bedeuten[3]. Die Werte für die Grenzkurven in eiweissfreien Lösungen sind bereits

1) C. B e n s o n, J.physic.chem. 7 , 532 (1903).
2) J.v.Z a w i d s k i, Ztschr.f. physik.Chem. 35 77 (1900).
3) A.T h i e l, A. D a s s l e r und F. W ü l f k e n, loc. cit.S.48.

in Tab. 1 mitgeteilt. In den Figuren sind die jeweils gültigen Grenzkurven immer mit eingezeichnet.

Von den potentiometrisch gefundenen Stufenwerten sind die mit der gewöhnlichen Wasserstoffelektrode erhaltenen angegeben, wenn die Elektrode keine Vergiftungserscheinungen zeigte. Bei Gegenwart von Salzsäure wurden die mit der geschützten Iridium-Wasserstoffelektrode erhaltenen Stufen zu Grunde gelegt. Auf den Schaumeffekt wurde keine Rücksicht genommen, und es wurden die bei schneller Messung gefundenen Stufen angegeben.

Die Halbwertstufe berechnet sich nach der Gleichung:

$$p_{H\frac{1}{2}} = p_{Hgem} + \log \frac{\alpha_r}{1-\alpha_r}$$

Die starke Abweichung der Halbwertstufe bei eiweissfreien Lösungen gegenüber dem Wert von D a s s l e r ($p_{H\frac{1}{2}}$ 3,51 gegen 3,40) erklärt sich teils aus dem ungünstigen Verhältnis von $\frac{\alpha_r}{1-\alpha_r}$ und teils daraus, dass die Messungen von D a s s l e r in Stufenlösungen vorgenommen wurden, die starke Elektrolyte (Na-citrat) enthielten. Den Berechnungen wurde der Wert von 3,51 zugrunde gelegt, der sich ohne Salzzusatz ergeben hatte. Mit einer Bernsteinsäure-Natriumsulfat-Borsäure-Boraxmischung von der Stufe 3,5 wurde der Wert $p_{H\frac{1}{2}} = 3,41$ gefunden in guter Übereinstimmung mit dem Werte von D a s s l e r.

1.) Pepton-Versuche.

Während in den Lösungen von Hühnereiweiss und Caseïn teilweise komplizierte Gemische vorlagen, waren die Verhältnisse beim Pepton Witte bedeutend günstiger, da ausser dem Pepton selbst immer nur noch je ein starker bzw. schwacher Elektrolyt vorhanden war. Deshalb bereiteten die Versuche keine besonderen Schwierigkeiten.

Bei den Grenzkurven lassen sich keine Veränderungen nachweisen (Tab. 9.), wogegen der " Eiweissfehler " im Umschlagsgebiet schon klar hervortritt (Tab.10,Fig.5), was am deutlichsten aus der Verschiebung der Halbwertstufe (Tab.11) zu erkennen ist.

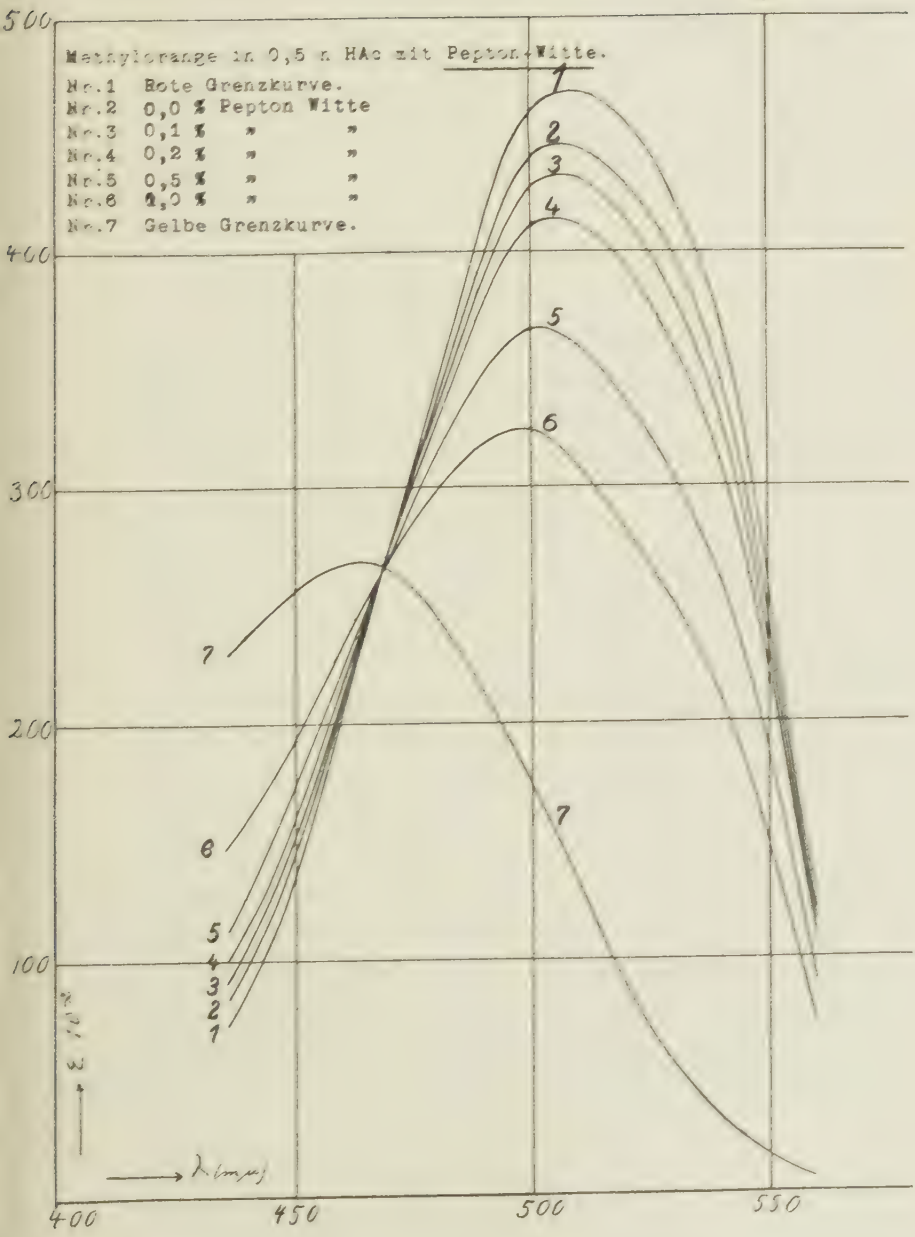
Tab. 9.
Grenzkurven des Methylorange
mit Pepton Witte.
(Werte von $\varepsilon \cdot 10^{-5}$ in $cm^2/Mol.$)

Elektrolyt →	0,1 n HCl			0,01 n NaOH	
Pepton % →	0,0	1,0	2,0	0,0	1,0
λ					
436	0,073	0,074	0,073	0,229	0,230
450	0,135	0,138	0,133	0,257	0,258
462	0,222	0,220	0,219	0,268	0,271
470	0,276	0,274	0,271	0,265	0,264
478	0,330	0,333	0,329	0,251	0,254
488	0,401	0,402	0,397	0,220	0,222
500	0,461	0,463	0,456	0,173	0,175
513	0,467	0,469	0,468	0,117	0,120
527	0,435	0,438	0,438	0,063	0,061
540	0,369	0,384	0,385	0,031	0,030
546	0,311	0,319	0,324	0,021	0,020
560	0,130	--	0,145	0,006	--

Tab. 10.
Methylorange in 0,5 n H Ac mit
Pepton Witte
(Werte von $\varepsilon \cdot 10^{-5}$ in $cm^2/Mol.$)

Pepton % →	0,0	0,1	0,2	0,5	1,0
λ					
436	0,086	0,094	0,103	0,120	0,142
450	0,145	0,154	0,162	0,172	0,185
462	0,226	--	--	--	--
470	0,275	--	--	--	--
478	0,324	0,318	0,314	0,294	0,280
488	0,386	0,382	0,369	0,333	0,308
500	0,441	0,428	0,414	0,361	0,315
513	0,439	0,421	0,408	0,348	0,294
527	0,406	0,398	0,373	0,310	0,254
540	0,342	0,335	0,315	0,261	0,210
546	0,287	0,280	0,268	0,216	0,175
560	0,120	0,121	0,113	0,096	0,072

Fig. 5


Methylorange in 0,5 n HAc mit Pepton Witte.
Nr.1 Rote Grenzkurve.
Nr.2 0,0 % Pepton Witte
Nr.3 0,1 % " "
Nr.4 0,2 % " "
Nr.5 0,5 % " "
Nr.6 1,0 % " "
Nr.7 Gelbe Grenzkurve.
500
400
300
200
100
400
450
500
550
1
2
3
4
5
6
7

Tab.11.

Methylorange mit Pepton Witte.

% Pepton-Witte ⟶	0,0	0,1	0,2	0,5	1,0
α_r (Mittel)	$0,91_9$	$0,88_4$	$0,83_0$	$0,67_4$	$0,51_7$
P_H (elektr.gem.)	2,46	2,59	2,71	2,94	3,17
P_H (opt. gem.)	---	2,63	2,82	3,19	3,48
$P_{H\frac{1}{2}}$	3,51	3,47	3,40	3,26	3,20

2.) Caseïn-Versuche.

Die Herstellung der Caseïnlösungen ist bereits in einem früheren Kapitel beschrieben worden. Während der Messungen stellte sich heraus, dass es praktisch unmöglich war, reproduzierbare Ansätze zu bekommen. Fast immer waren die Stufen, Absorptionskurven und die daraus berechneten Halbwertstufen so verschieden,dass die Einzelwerte kaum untereinander vergleichbar waren.Das zeigte sich besonders deutlich bei den Lösungen in Essigsäure und Natronlauge. Die Tab.Nr.12 gibt Beispiele für die schwankenden Stufen und Tab.13 für die Absorptionskurven solcher verschiedenen Ansätze. Bemerkenswert sind die grossen Unterschiede in den α_r Werten der Tab.13, obwohl hier die Stufen in allen drei Fällen praktisch gleich sind.

Diese Erscheinung findet ihre Erklärung darin, dass es selbst bei genauem Abpipettieren der Lösungen nicht möglich ist, beim Überführen des $NaHCO_3$ in NaCl einen geringen Überschuss der Salzsäure bzw. des Bicarbonates zu verhindern. Besonders die starke Salzsäure muss sich bei der Stufenmessung der schwachen Essigsäure bemerkbar machen, wie die an caseïnfreier 0,5 n Essigsäure potentiometrisch gefundenen Werte zeigen (Tab.14 und Fig.6).

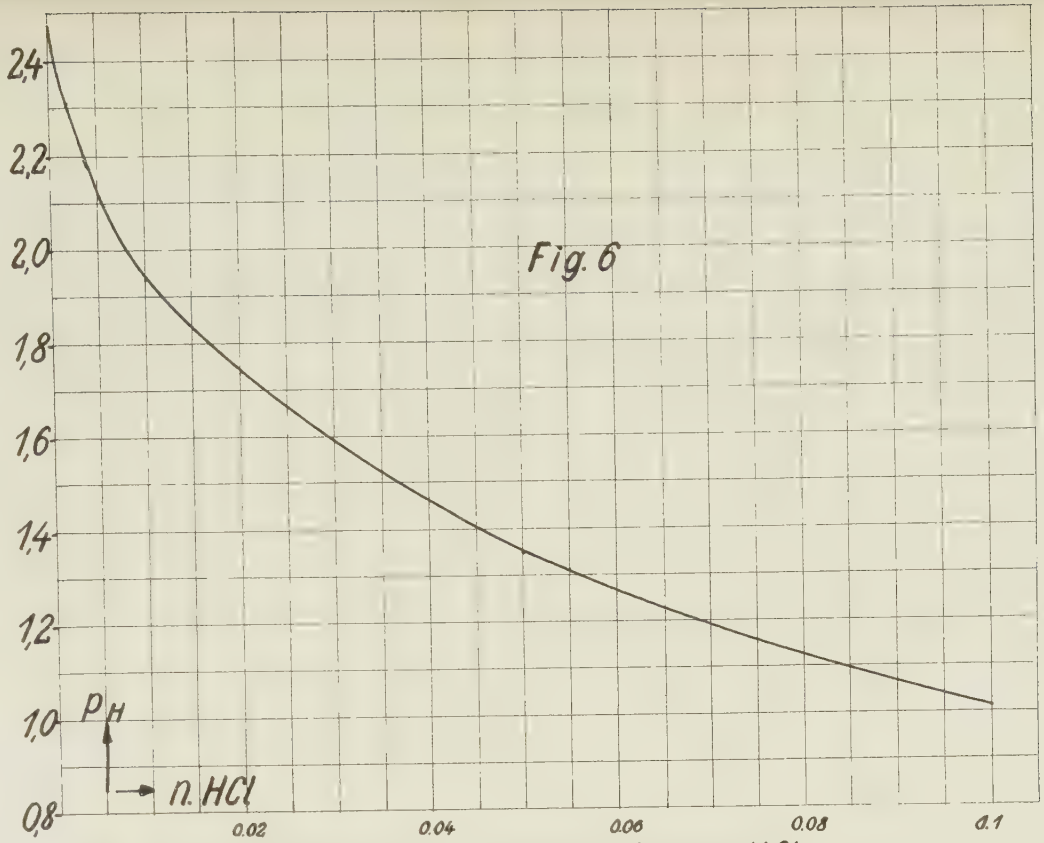


Fig. 6

HAc (konstant 0,5n) mit steigenden Mengen HCl.

Tab. 12

Caseïn in Säuren und Laugen (verschiedene Ansätze).

Caseïnkonz. %	Elektrolytkonz.	p_H el. gem.
0,5	0,5 n HAc	2,370
		2,343
		2,453
		2,329
		2,370
		2,394
0,5	0,5 n HAc mit 0,01 n HCl	2,034
		2,003
		1,880
		1,916
		2,003
		2,088
1,0	0,01 n NaOH	7,008
		7,219
		7,458
		7,367
		7,315
0,5	"	10,636
		10,551
		10,284
		10,223
		10,679
0,2	"	11,854
		11,883
		11,824

Tab. 13.

0,2 % Caseïn in 0,5 n HAc

(verschiedene Ansätze)

(Werte von $\varepsilon \cdot 10^{-5}$ in cm^2/Mol)

λ			
436	0,121	0,134	----
450	0,177	0,180	0,185
462	0,236	0,235	0,239
470	0,271	0,268	0,268
478	0,306	0,303	0,294
488	0,350	0,336	0,328
500	0,384	0,362	0,354
513	0,376	0,349	0,342
527	0,348	0,312	0,305
540	0,263	0,261	0,261
546	--	0,218	0,222
α_r(Mittel)	0,67	0,63	0,61
PH(el. gem.)	2,462	2,469	2,458
$p_{H\frac{1}{2}}$	2,76	2,70	2,65

Tab. 14.

HCl in 0,5 n HAc.

(ohne Eiweisszusatz).

HAc norm.	HCl norm.	p_H elektr.
0,5	0,000	2,455
"	0,002	2,314
"	0,004	2,179
"	0,01	1,936
"	0,02	1,736
"	0,05	1,350
"	0,10	1,024

Fig. 7.

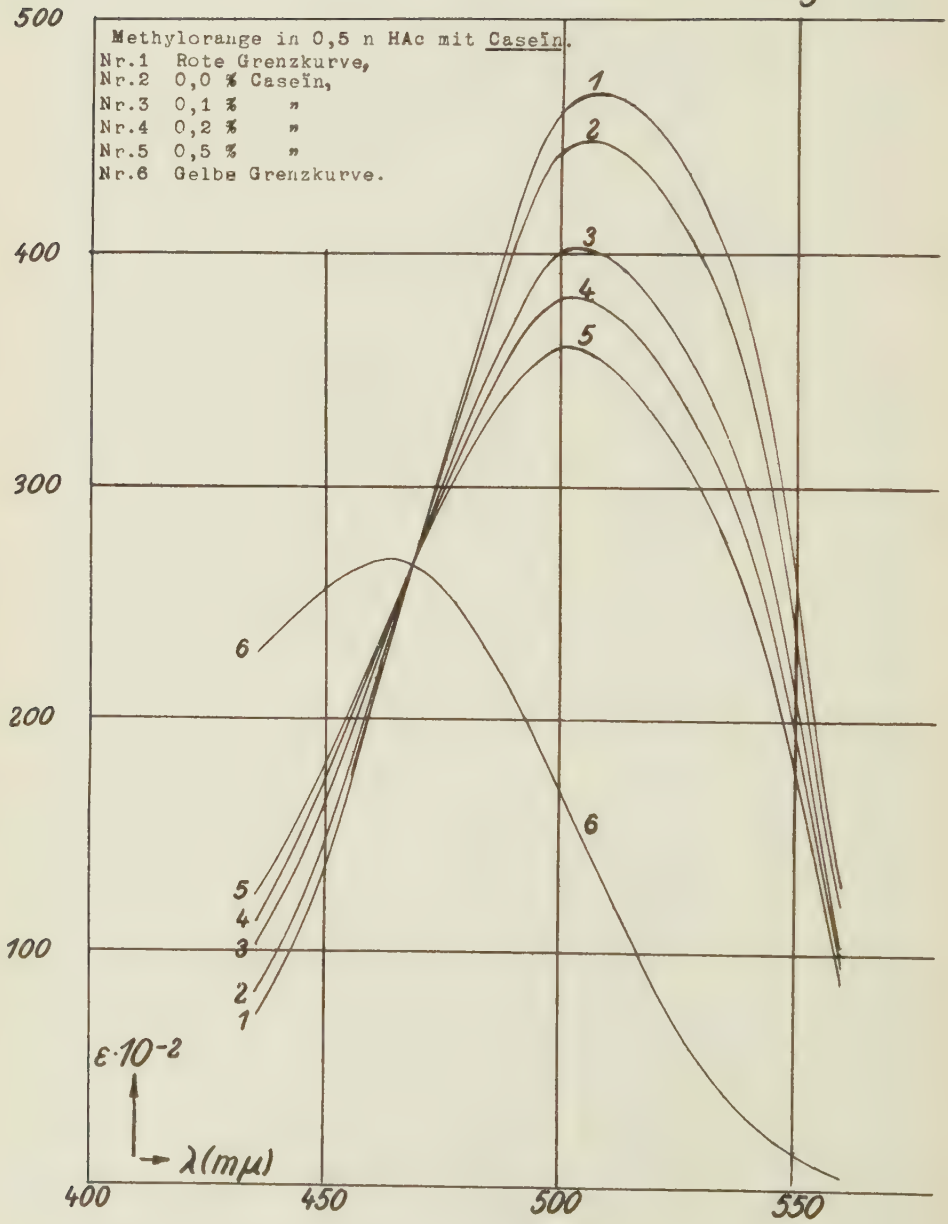
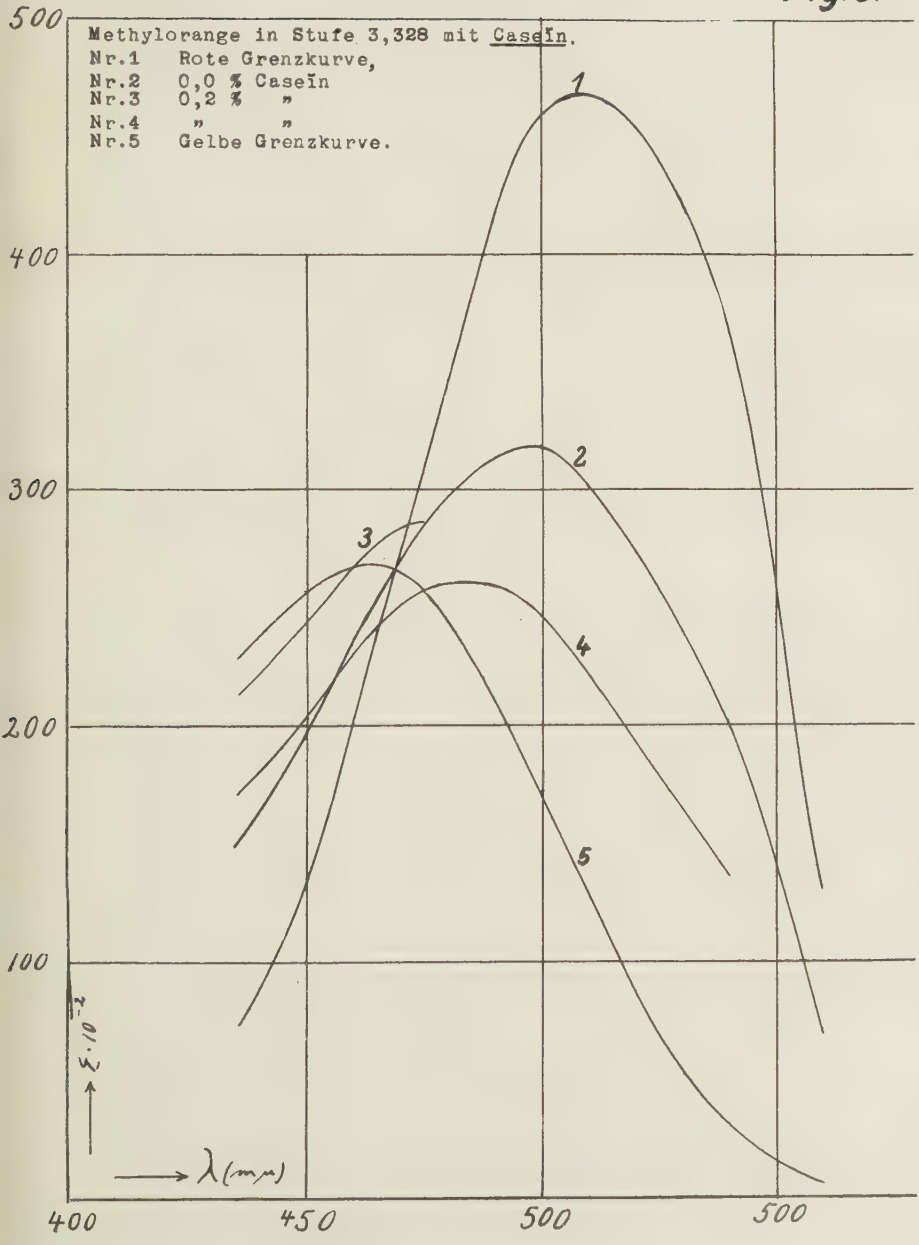

Methylorange in 0,5 n HAc mit Caseïn.
Nr.1 Rote Grenzkurve,
Nr.2 0,0 % Caseïn,
Nr.3 0,1 % "
Nr.4 0,2 % "
Nr.5 0,5 % "
Nr.6 Gelbe Grenzkurve.
500
400
300
200
100
400
450
500
550
ε·10-2
λ(mμ)
1
2
3
4
5
6

Fig. 8.


Methylorange in Stufe 3,328 mit Casein.
Nr.1 Rote Grenzkurve,
Nr.2 0,0 % Casein
Nr.3 0,2 % "
Nr.4 " "
Nr.5 Gelbe Grenzkurve.
500
400
300
200
100
1
2
3
4
5
ε·10⁻³
λ(mμ)
400
450
500
500

Reproduzierbare Resultate wurden erst erhalten, als alle Messungen (mit Ausnahme derjenigen in NaOH) mit einem grossen Ansatze von über einem Liter vorgenommen wurden. Bezüglich der Schwierigkeiten, die Extinktion des Caseïns selbst in Lösung und Vergleichslösung beim Mischen gleichzuhalten, gilt das bereits auf Seite 15 und 16 gesagte.

Auch hier zeigt sich wie beim Pepton, dass die Grenzkurven nicht beeinflusst werden, sondern nur das Farbgleichgewicht verschoben wird(Tab.15,16,17,Fig.7). Versuche in der Nähe der Halbwertstufe des Methylorange ($p_{H\frac{1}{2}}$ = 3,51) Messungen mit Caseïn zu machen, waren nicht durchführbar, weil Lösung und Gegenlösung so ungleich wurden, dass die Kurven nicht mehr durch den isosbestischen Punkt gehen. Die erhaltenen Kurven lassen sich nicht auswerten(Tab.18,Fig.8). Bei geringem Anwärmen auf 35^0 - 40^0 C wurden die Lösungen vollständig milchig trübe.

3.) Hühnereiweiss-Versuche.

a.) in Natronlauge.

In einem Messkolben wurden von dem aus dem Schaum abgesetzten Eierklar 70 ccm mit 4 ccm n NaOH versetzt und mit Wasser auf 200 ccm aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde zur Messung mit gleichen Teilen Wasser bzw. Wasser und Methylorange verdünnt. Die etwa 2,25 %ige Eiweiss enthaltene Lösung war zwar nicht einheitlich klar, liess sich aber trotzdem gut messen. Eine Änderung der Grenzkurve war auch hier nicht vorhanden (Tab.19).

b.) in Salzsäure.

Die rote Grenzkurve lässt sich in Stufe 1,04 bei nur 0,65 % Eiweissgehalt,nicht messen, weil die reine rote Form durch besonders starke Halbwertstufenverschiebung hier noch nicht erreicht wird (Tab.20)und weil ausserdem bei weiterer Zugabe von Salzsäure die Proteïne koagulieren und mit dem Lösungsmittel eine Gallerte bilden.

In Tab.20 ist die enorme Schwankung der $\Delta\gamma$-Werte (besonders bei 436 mμ) bemerkenswert. Die scheinbar starke

Tab. 15.

Grenzkurven des Methylorange mit Caseïn.

(Werte von $\varepsilon \cdot 10^{-5}$ in cm ^{2}/Mol.)

Elektrolyt	0,5 n HAc, 0,1 n HCl				0,01 n NaOH	
Caseïn % → / λ	0,0	0,1	0,2	0,5	0,0	0,5
436	0,073	0,072	0,072	0,075	0,229	0,229
450	0,135	0,138	0,137	0,138	0,255	0,255
462	0,222	--	--	--	0,268	0,267
470	0,276	0,278	0,278	0,273	0,265	0,264
478	0,330	--	--	--	0,251	0,251
488	0,401	0,406	0,405	0,398	0,220	0,220
500	0,461	0,460	0,460	0,453	0,173	0,172
513	0,467	0,469	0,468	0,460	0,117	0,118
527	0,435	0,437	0,436	0,431	0,063	0,065
540	0,369	--	--	--	0,031	0,033
546	0,311	0,315	0,314	0,310	0,021	0,023

Tab. 16.

Methylorange in 0,5 n H Ac mit Caseïn (grosser Ansatz).

(Werte von $\varepsilon \cdot 10^{-5}$ in cm ^{2}/Mol).

%Caseïn → / λ	0,0	0,1	0,2	0,5
436	0,068	0,101	0,114	0,129
450	0,145	0,155	0,164	0,176
462	0,226	0,226	0,231	0,234
470	0,275	0,274	0,268	0,266
478	0,324	0,303	0,298	0,293
488	0,386	0,356	0,345	0,332
500	0,441	0,392	0,377	0,356
513	0,439	0,386	0,368	0,344
527	0,406	0,353	0,337	0,312
540	0,342	0,301	0,283	0,262
546	0,287	0,252	0,237	0,221
560	0,120	0,104	0,102	0,096

Tab. 17.

Methylorange mit Caseïn.

% Caseïn →	0,0	0,1	0,2	0,5
α_r (Mittel)	$0,91_9$	$0,78_8$	$0,73_2$	$0,66_3$
p_H(elektr. gem.)	2,46	2,46	2,47	2,48
p_H(optisch gem.)	--	2,94	3,07	3,22
$p_{H\frac{1}{2}}$	3,51	3,03	2,90	2,77

Tab. 18.

Methylorange in 0,475 n HAc und 0,025 n NaAc (p_H = 3,328) mit Caseïn.

% Caseïn → / λ	0,0	0,2	0,2
436	0,154	0,171	0,213
450	0,203	0,203	0,242
462	0,245	0,237	0,272
470	0,272	0,251	0,284
478	0,293	0,259	--
488	0,316	0,258	--
500	0,322	0,248	--
513	0,297	0,213	--
527	0,253	0,171	--
540	0,204	0,136	--

Tab. 19.

Methylorange in 0,01 n NaOH

mit 2,25 % gen. Hühnereiweiss.

% Hühnereiweiss → / λ	0,0	2,25
436	0,230	0,230
450	0,256	0,254
462	0,268	0,267
470	0,265	0,265
478	0,251	0,252
488	0,220	0,217
500	0,172	0,171
513	0,118	0,121
527	0,061	0,059
540	0,030	0,031
546	0,020	--

Tab. 20.

Methylorange in 0,1 n HCl

mit 0,65 % gen. Hühnereiweiss.

% Hühnereiweiss → / λ	0,0	0,65	Δr
436	0,073	0,107	0,21
500	0,461	0,367	0,68
546	0,311	0,239	0,75

Tab. 21.

1,3 % Hühnereiweiss in ca 8,1 n HCl

(ohne Methylorange gegen Wasser gem.)

Lösung Nr.	Zeit nach Ansetzen	ε(436 mμ)	ε(513 mμ)
1	24 Std.	0,172	--
2	2 "	0,030	0,013
	20 "	0,082	0,105
3	15 "	0,083	0,140

Änderung der Absorptionskurve findet ihre Erklärung in einer Farbreaktion(s.w.u.).

Das Hühnereiweiss löst sich erst in konzentrierter Salzsäure (ca 8,0 normal) wieder klar auf, doch tritt nach einiger Zeit eine schon länger bekannte Farbreaktion [1] auf, die zeitlich fortschreitet und, von unkontrollierbaren Einflüssen beherrscht, unregelmässig verläuft. Zur Orientierung über die ungefähre Farbentstehung, die im Anfang besonders im violetten Teil des Spektrums ausgeprägt ist, wurde die Extinktion an einigen Punkten an indikatorfreien und zuerst wasserklaren Lösungen (gegen Wasser) gemessen(Tab.21.).Man erkennt deutlich die vollkommene Regellosigkeit. Bei einer vierten Messung (Methylorange in Eiweisslösung gegen eine gleiche Eiweisslösung ohne Indikator 20 Minuten nach dem Mischen gemessen) änderte sich die Extinktion bei 436 mμ innerhalb von 15 Minuten von 0,061 $.10^5$ bis 0,057 $.10^5$, also um ungefähr 7 Prozent, und hatte schliesslich nach 20 Stunden den Wert von $-0{,}026 . 10^5$ angenommen. Diese scheinbar negative Extinktion rührt daher, dass die der Vergleichseiweisslösung grösser geworden war als die der Messeiweisslösung plus Indikator.

War die Photometrierung einer ganzen Kurve auch nicht möglich, so konnten bei schnellem Arbeiten doch bei 513 mμ und 546 mμ zwei Messungen gemacht werden, bevor die Farbreaktion merklich wurde (Tab.22).

Tab.22.

Methylorange in 8,1 n HCl
mit 0,65 % Hühnereiweiss.

λ	0,0%	0,65%
513	0,504	0,504
546	0,379	0,383

Aus der guten Übereinstimmung ist jedenfalls zu erkennen,dass auch hier wieder keine Beeinflussung der roten Grenzform statt-

1) C.R e i c h a r d, Pharm.Ztg. 55, 158 (1910).

findet,denn eine Höhenverschiebung hätte sich in der Nähe des Maximums bei 513 mμ und eine Seitenverschiebung im steilen Teile der Kurve bei 546 mμ bemerkbar machen müssen.

c.) in Essigsäure.

Zu den Messungen in Essigsäure konnte nur geschlagenes Eierklar verwandt werden, weil beim ungeschlagenen nur ganz geringe Konzentrationen bis etwa 0,2 % brauchbare Werte lieferten. Allerdings war der Einfluss auf den Umschlagsgrad auch grösser. Bei den Untersuchungen mit geschlagenem Eierklar war dagegen die Reproduzierbarkeit bedeutend besser. In Essigsäure tritt zwar keine Farbreaktion wie in Salzsäure auf, dafür macht sich aber eine andere Zeitreaktion bemerkbar, die darauf beruht, dass sich das Gleichgewicht beim Methylorange im Laufe der Zeit noch weiter zugunsten der gelben Form verschiebt, obgleich die elektrische Messung noch nach einigen Wochen die gleiche Stufe ergibt (Tab.8b Nr.1a und 7a,sowie 3a und 11a).

Die Messung begann etwa 2 Stunden nach dem Ansetzen der gebrauchsfertigen Lösungen, weil die Zeitreaktion dann langsamer verläuft als im Anfang. Besonders bei dem Hühnereiweiss in Essigsäure trat die schon mehrfach erwähnte Schwierigkeit auf, verschieden starke Absorptionen des Eiweisses in Mess- und Vergleichlösung zu vermeiden. Wie aus den Tab.23 und 24 und Fig.9 hervorgeht, ist der Einfluss des natürlichen Hühnereiweisses auf Methylorange bedeutend grösser als bei den beiden anderen untersuchten Körpern.

Um die Zeitreaktion zu verfolgen, wurde der Rotgehalt bei zwei 0,4 %igen Lösungen bestimmt. Die erste Lösung wurde mit ganz frischem, die zweite mit einem einige Tage alten Eiweiss hergestellt. Bei den optischen Messungen war die Photometrierung der vollständigen Absorptionskurve wegen des Zeitverlustes natürlich zwecklos. Die Messung erfolgte deshalb nur in der Nähe des Maximums der roten Grenzkurve bei 513 mμ (Tab.25,Fig.10 und Tab.26,Fig.11). Bei einer dritten Lösung

Tab. 23.

Methylorange in 0,5 n HAc
mit gen. Hühnereiweiss.
(Werte von $\varepsilon \cdot 10^{-5}$ in cm^2/Mol).

% Hühnereiweiss → / λ	0,00	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
436	0,083	0,101	0,110	0,130	0,170	0,208
450	0,143	0,153	0,162	0,183	0,202	0,229
462	0,226	0,229	0,232	0,240	(0,227)	(0,239)
470	0,277	0,276	0,270	0,272	(0,248)	(0,242)
478	0,322	0,317	0,306	0,300	(0,260)	(0,241)
488	0,393	0,371	0,354	0,335	(0,275)	(0,224)
500	0,444	0,414	0,393	0,357	0,261	(0,201)
513	0,442	0,412	0,386	0,340	0,246	0,171
527	0,412	0,375	0,353	0,307	0,212	0,132
540	0,345	0,324	0,295	0,261	0,177	0,108
546	0,295	0,264	0,242	0,216	0,147	0,091
560	0,123	0,107	0,101	0,089	--	--

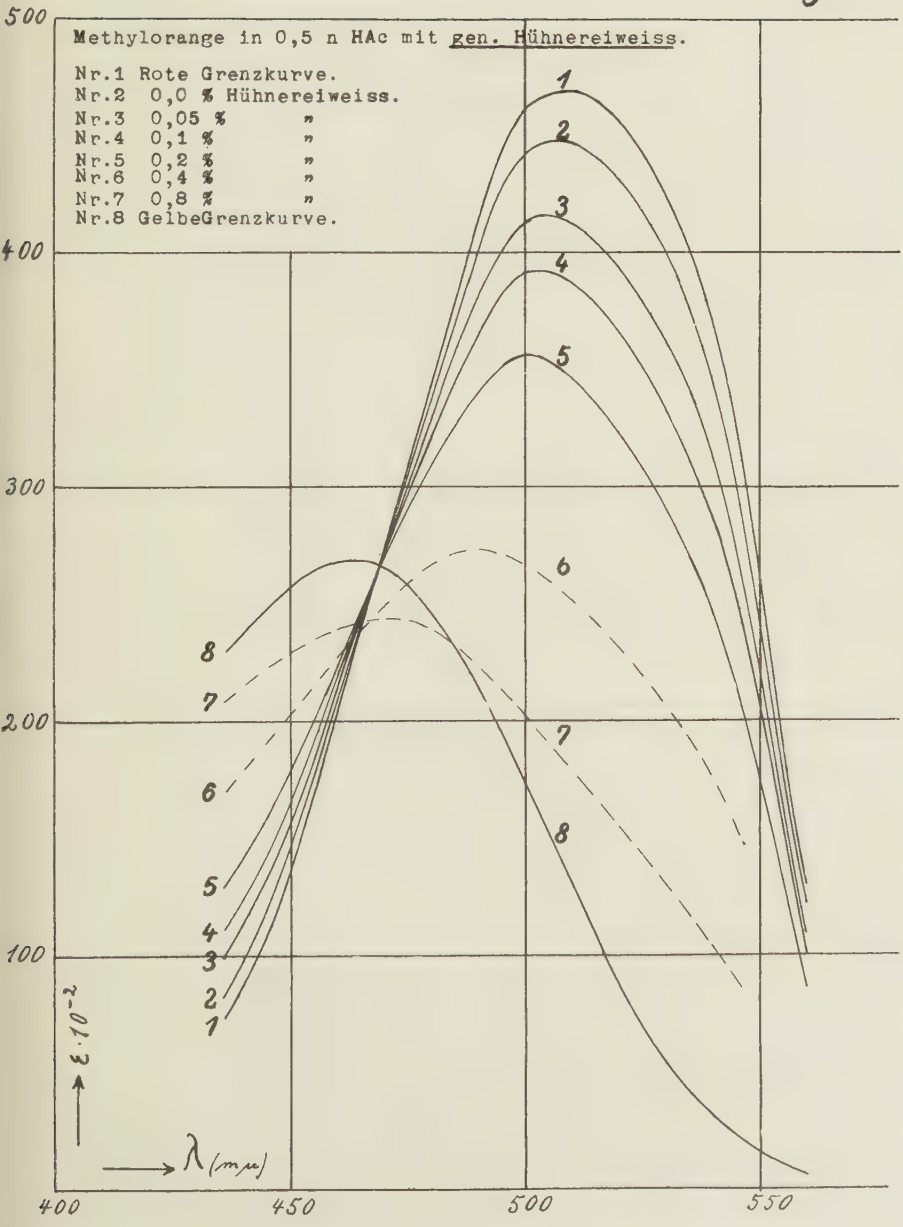
Tab. 24.

Methylorange mit gen. Hühnereiweiss.

% Hühnereiweiss →	0,00	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
α_r(Mittel)	$0,91_9$	$0,83_4$	$0,75_7$	$0,63_7$	(0,38)	(0,20)
p_H(el.gem.)	2,46	2,48	2,52	2,57	2,65	2,71
p_H(opt. gem)	--	2,81	3,02	3,27	(3,72)	(4,11)
$p_{H\frac{1}{2}}$	3,51	3,18	3,01	2,81	(2,44)	(2,11)

deren Eiweiss über 8 Tage gestanden hatte, konnte überhaupt kein Rotgehalt mehr nachgewiesen werden. Die Lösung war rein gelb.

Fig. 9


Methylorange in 0,5 n HAc mit gen. Hühnereiweiss.
Nr.1 Rote Grenzkurve.
Nr.2 0,0 % Hühnereiweiss.
Nr.3 0,05 % "
Nr.4 0,1 % "
Nr.5 0,2 % "
Nr.6 0,4 % "
Nr.7 0,8 % "
Nr.8 GelbeGrenzkurve.
500
400
300
200
100
ε·10⁻²
λ (mμ)
400
450
500
550

Tab. 25.

Zeitliche Abnahme von α_r bei 0,4 % Hühnereiweiss in 0,5 n HAc (frisches Eiweiss).

Zeit nach Mischen	ε(513mμ)	α_r
17 Min.	$0,272_7$	$0,44_6$
1 St. 30 "	$0,268_4$	$0,43_4$
2 " 30 "	$0,266_8$	$0,42_9$
4 " 40 "	$0,2652$	$0,42_6$
7 "	$0,264$	$0,42_1$
8 "	$0,263_8$	$0,41_7$
21 "	$0,254$	$0,39_2$
26 " 30 "	$0,251$	$0,38_3$
28 "	$0,252_3$	$0,38_6$
46 " 30 "	$0,241_3$	$0,35_5$

Tab. 26 .

Wiederholung des Versuches (Eiweiss mehrereTage alt.)

Zeit nach Mischen	ε(513 mμ)	α_r
20 Min.	$0,215$	$0,28_0$
45 "	$0,208$	$0,26_0$
2 St.	$0,209_8$	$0,26_6$
5 "	$0,207$	$0,25_7$
23 "	$0,198_2$	$0,23_2$
51 "	$0,188_4$	$0,20_3$
69 "	$0,183$	$0,18_9$
96 "	$0,165_7$	$0,14$
216 "	$0,141$	$0,06_9$

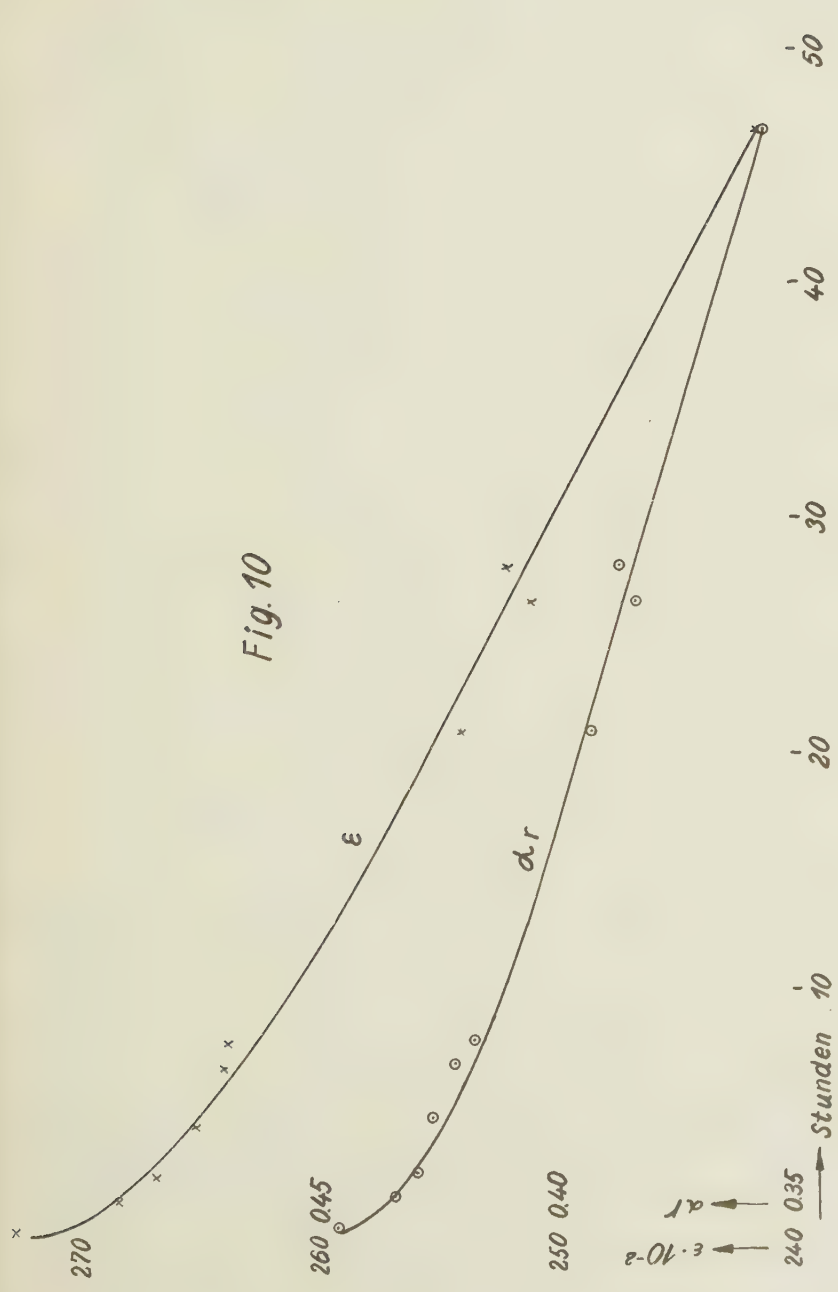

270
260 0,45
250 0,40
240 0,35
ε
α_r
$\varepsilon \cdot 10^{-2}$
α_r
10
20
30
40
50
Stunden

Fig. 10

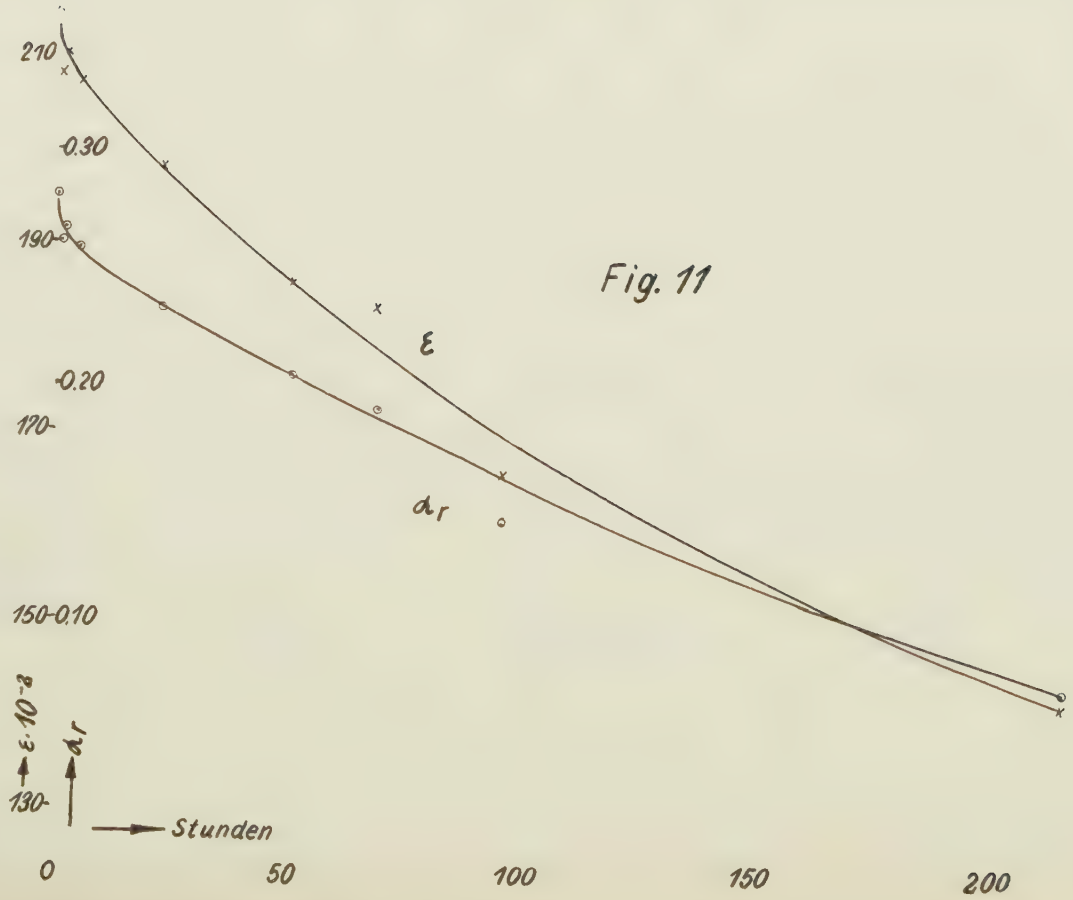

210
0.30
190
0.20
170
150
0.10
130
ε
α_r
ε·10⁻³
α_r
Stunden
0
50
100
150
200

Fig. 11

Die Abnahme des Rotgehaltes kann möglicherweise durch drei voneinander unabhängige Zeitreaktionen bedingt sein:

1.) Intramolekulare Umwandlung der ungemischten Proteïne,

2.) Allmähliche Adsorption des Farbstoffes,

3.) Änderung der Stufe als Folge von Reaktionen.

Dass eine intramolekulare Umwandlung des ungemischten und unverdünnten Eiweisses eintritt, lässt sich aus der Tatsache entnehmen, dass A_r (direkt nach dem Mischen gemessen) mit zunehmendem Alter des Eierklars immer kleiner wird. Für das Zutreffen des zweiten Falles spricht, dass diese Zeitreaktion des Hühnereiweisses auch schon von S ö r e n s e n [1] beim Tropäolin OO beobachtet wurde. Sie beruht auf der allmählichen Umwandlung des Albumins in Acidalbumin, das den Indikator noch stärker bindet. Eine Änderung der Stufe lässt sich dagegen nicht feststellen, wie die Werte der Tab.8 b beweisen.

Wenn sich diese Reaktionen zwischen den Proteïnen auch innerhalb der Schale abspielen und vom Futter, Alter der Hühner, Aufbewahrungstemperatur der Eier u.s.w. unabhängig sind, dann muss es möglich sein, auf Grund dieser Zeitreaktion das Alter von Hühnereiern auf colorimetrischen Wege zu bestimmen.

E.) Übersicht über die Ergebnisse und Versuch einer Erklärung der Halbwertstufenverschiebung.

Aus den optischen Messungen geht deutlich hervor, dass die Grenzkurven des Methylorange durch Eiweisskörper in keiner Weise beeinflusst werden, sondern dass lediglich eine Verschiebung des Farbgleichgewichtes eintritt.

Die in Fig.12 gezeichneten Kurven lassen erkennen, dass das Abbauprodukt aus Eiweisskörpern, das Pepton Witte, die geringste Einwirkung auf die Halbwertstufe hat und dass das hochmolekulare Caseïn, sowie das Gemisch aus Hühnereiweissstoffen bedeutend stärker einwirken.

1.) S.P.L.S ö r e n s e n, loc. cit. S. 219.

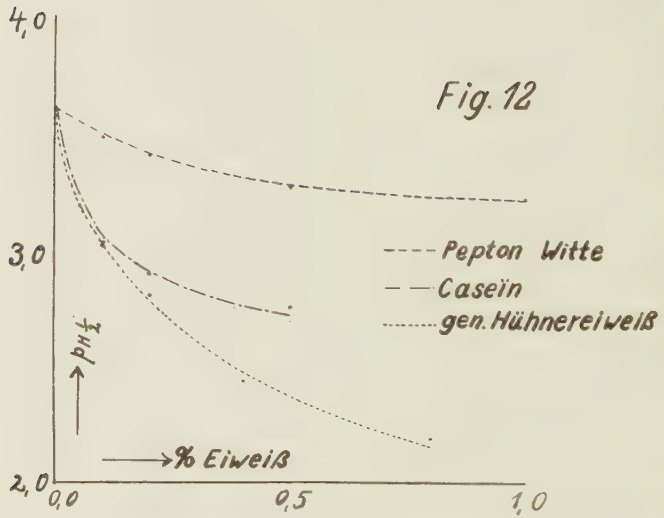


Fig. 12

Die Kurven geben jedoch insofern keinen Anhalt über die Grösse des Einflusses auf das Farbgleichgewicht, als anstelle der molaren Konzentrationen nur der Gehalt in Grammprozenten aufgetragen ist. Die Umrechnung in molare oder besser in micellare Konzentrationen ist noch mit grossen Unsicherheiten verknüpft, weil die mit den verschiedensten Methoden gewonnenen Resultate so stark untereinander abweichen, dass die Molekulargewichte häufig um weit mehr als eine Zehnerpotenz differieren. So schwanken z.B. die Angaben über Serumglobulin zwischen 1700 (R o b e r t s o n 1907) und 140000 (S ö r e n s e n 1925). Mit Hilfe der neusten Methode, der Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit bei Ultrazentrifugierung [1], erhielt T h e S v e d b e r g das Molekulargewicht von 103 000 - 104 000 [2].

Um vergleichbare Werte zu erhalten, müssten die Ergebnisse der gleichen Methode benutzt werden. Vorläufig liegen

---

1) T h e S v e d b e r g, Z. f. phys. Chem. 127, 51 (1927).
2) derselbe, Journ. Americ. chem. Soc. 50 3318 (1927).

jedoch erst wenige Messungen vor, und für das Hühnereiweiss lässt sich kein Molekulargewicht angeben, weil es ein Gemisch mehrerer Proteïne ist. Ausserdem muss man bedenken, dass die Eiweissstoffe je nach ihrer Darstellung verschiedene Molekulargewichte haben können und dass ferner die Grösse der Hydratation und damit ihr kolloider Zustand von der Wasserstoffionenaktivität abhängig ist.

Aus der Vermehrung des gelben Anteils des Methylorange muss man schliessen, dass die gelbe Form in irgendeiner Weise vom Eiweiss gebunden wird und dass dann nach dem Massenwirkungsgesetz:

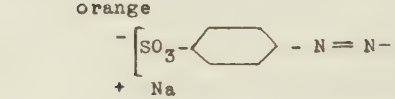
$$\frac{[H^+]\,[A^-]}{[HA]} = k$$

die gelbe Form im molekulardispersen System bis zur Neubildung des Gleichgewichtes durch weitere Umlagerung nachgebildet wird.

Zunächst könnte man versuchen, die Bindung der gelben Komponente, ohne Rücksicht auf die kolloidale Lösungsform der Proteïne, rein chemisch zu erklären. Wenn man z.B. für das Caseïn das von T h e S v e d b e r g berechnete hohe Molekulargewicht von 375 000 annimmt, so wäre das Caseïn in der 0,5 %igen Lösung etwa $1{,}3 \cdot 10^{-5}$ molar. Damit wären die reagierenden Stoffe in ungefähr gleicher molarer Konzentration vorhanden, wobei allerdings, auf Äquivalente umgerechnet, das Verhältnis zugunsten des Caseïns verschoben sein wird. Nach H a m m e r s t e n ist Caseïn eine 8-basische Säure (Molekulargewicht nach H a m m e r s t e n 8800, Äquivalentgewicht 1100). Nimmt man nun an, dass der Gehalt des Caseïns an basischen Gruppen von ungefähr gleicher Grössenordnung ist, so wäre das Verhältnis Caseïn / Indikator $\sim$10/1. In der essigsauren Lösung kann nun das Caseïn, wenigstens teilweise, als Kation vorliegen gemäss der schematischen Formel:

$$^{+}\begin{bmatrix} NH_2R\ COOH \\ H \end{bmatrix}$$
$$-\ COO\ CH_3$$

und sich mit dem negativen Rest der gelben Form des Methyl-orange



verbinden.

Solche Verbindungen müssen aber auch mit einfach gebauten Aminosäuren z.B. Glykokoll möglich sein, was aber bisher noch nicht beobachtet worden ist. Diese Erklärung trifft also nicht zu, und man muss versuchen, den Eiweissfehler auf andere Weise zu deuten.

Viel wahrscheinlicher als chemische Einwirkungen sind physikalische. Vom Standpunkte der Kolloidchemie ist die Tatsache der grossen spezifischen Oberfläche von grösster Bedeutung, wobei man unter " spezifischer Oberfläche" die Oberfläche pro Volumeinheit versteht. Die Schichten an den Grenzflächen zwischen Kolloidteilchen und Lösung sind nach der heutigen physikalischen Anschauung von endlicher Dicke,und in ihnen weichen die Eigenschaften der Substanzen von denen im Innern der beiden Phasen ab; denn die Wechselwirkung der einzelnen Molekeln, welche die Eigenschaften der Stoffe bedingen, hört in der Nähe einer anderen Phase senkrecht zur Richtung der Oberfläche auf. Die Folge ist eine richtende Kraft auf die in der Oberfläche sitzenden Molekeln, die dadurch befähigt werden, auf bestimmte Molekeln der anderen Phase einzuwirken. Diese Kräfte äussern sich in Adsorptionen und Konzentrationsverschiebungen.

Da die Teilchen in Eiweisslösungen positiv geladen sind, wenn die Stufe saurer ist als die des betr. isoelektrischen Punktes, so muss man annehmen, dass in den essigsauren Lösungen von der kolloiden Phase in erster Sphäre die Acetat-und in der zweiten Sphäre die Wasserstoffionen adsorbiert werden.[1] Die entfernteren und beweglicheren Wasserstoffionen erteilen den Kolloidteilchen den ihnen eigenen Ladungssinn.

1) Nach Anschauungen von H. P a l l m a n n, loc.cit. S.392ff.

Damit ist die Adsorptionsfähigkeit der Micellen noch keineswegs erschöpft. Wie aus den optischen Versuchen hervorgeht, können ausserdem noch Farbstoffe angelagert werden. Wo und wie diese weitere Anlagerung stattfindet, lässt sich nicht ohne weiteres sagen.

Wenn auch diese Vorstellung rein qualitativ die Gleichgewichtsverschiebung der beiden Indikatorformen erklären kann, so versagt sie doch bei Betrachtung derjenigen Fälle, in denen die Halbwertstufenverschiebung nach dem alkalischen Gebiete hin (grösserer Stufenwert) erfolgt, unter der noch nicht nachgeprüften Voraussetzung, dass auch bei den anderen Indikatoren die Grenzkurven unverändert bleiben und nur ein Einfluss auf das Farbgleichgewicht stattfindet.

Wenn nun die Eiweisskörper in Lösungen vorliegen, deren Stufe alkalischer ist als der betr. isoelektrische Punkt, so ist die Kolloidaufladung negativ und die Adsorption von Indikatoren müsste in umgekehrtem Sinne erfolgen, d.h. das Kation müsste adsorbiert und die saure Form neu gebildet werden. Das ist aber mit Sicherheit nicht der Fall, denn in den Versuchsreihen von S ö r e n s e n und anderen Forschern erfolgt der Farbumschlag bei der Mehrzahl der Indikatoren (ca 60 bis 70 Prozent) nach der alkalischen Seite hin, wodurch die Halbwertstufe zum sauren Gebiete hin verschoben wird.

Kürzlich hat D. D e u t s c h[1] einige Versuche mitgeteilt, vermittels derer ein reversibler Farbumschlag von Indikatoren an Grenzflächen direkt beobachtet werden kann. Er schüttelte verschiedene Indikatorlösungen in Reagenzgläsern mit überschichteten, wasserunlöslichen organischen Flüssigkeiten, wie Benzol, Aether u.s.w., und fand bei dieser künstlich erzeugten Grenzflächenvergrösserung mit blossem Auge wahrnehmbare Farbumschläge. Dass die Schlussfolgerungen, die D e u t s c h aus seinen Versuchen zog, jedoch nicht allgemein

1) D. D e u t s c h, Ber.d.Dtsch.chem.Ges. 60, 1036, (1927); derselbe, Ztschr.f.phys.Chem. 136, 353 (1928).

einwandfrei sind, wurde von A. T h i e l [1] nachgewiesen.

Der Eiweissfehler kann mit dem von D e u t s c h beobachteten Phänomen nicht ohne weiteres verglichen werden. Bei D e u t s c h handelt es sich um Grenzflächen zwischen den Phasen flüssig-flüssig. Bei den hydrophilen Lösungen von kristallisierbaren Eiweisskörpern steht es aber bis heute noch nicht fest, ob die kolloid-disperse Phase als fest oder flüssig anzunehmen ist.

Zur endgültigen Lösung der speziellen Frage, warum in Gegenwart von kolloid-dispersen Stoffen das Farbgleichgewicht zugunsten des einen Anteils geändert wird, kann auch die vorliegende Arbeit nicht beitragen. Man muss abwarten, bis das Problem, chemische oder physikalische Bindung der adsorbierten Ionen, gelöst ist. Da die elektrostatischen Kräfte häufig auch mit den " Nebenvalenzen " der Chemie identisch sind, könnten solche Kräfte ebenfalls zur Erklärung des Eiweissfehlers herangezogen werden. Auch scheint die Grösse der adsorbierten Ionen von Bedeutung zu sein, weil erfahrungsgemäss der Eiweissfehler umso kleiner wird, je einfacher die Zusammensetzung des Indikators ist. So können z.B. die Abweichungen beim p Nitrophenol meist vernachlässigt werden.

Schliesslich sei noch hervorgehoben, dass bei der Bindung des Methylorange vom Eiweiss keine neuen Farben auftreten. Dass solche Farbänderungen, die mit den normalen Indikatorumschlägen nichts zu tun haben, an sich auftreten können, ist vom Neutralsalzfehler her bekannt. Bei der Adsorption an Eiweiss bleiben jedoch die Farbeigenschaften des Methylorange nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ unverändert, wie aus dem Auftreten eines isosbestischen Punktes bei der Variation des Eiweissanteiles in Lösungen nahe benachbarter Stufen hervorgeht. Der Eiweissfehler beruht also

---

1) A. T h i e l, Ztschr. f. Elektrochemie 35, 286 (1929)

auf grundsätzlich anderen Ursachen. In den Fällen wo bei höherem Eiweissgehalt anormale Kurven auftreten, muss man auf Ungleichheiten im optischen Verhalten der Eiweisslösungen in den Mess- und Vergleichsröhren schliessen.

F.) Anhang: Eine neue Reihe von Stufenlösungen mit konstantem Elektrolytgehalt.

Gelegentlich mehrfacher Nachprüfungen über das einwandfreie Funktionieren der p_H-Apparatur wurden mehrere bereits bekannte Stufenlösungen nachgemessen, die schliesslich dazu führten, eine Reihe von teilweise ganz neuen Pufferlösungen zu messen, bei denen mehrere Nachteile vermieden werden sollten, die den meisten bisher bekannten anhafteten.

1.) Zunächst sollte mit einer möglichst geringen Zahl von Stammlösungen das ganze praktisch vorkommende p_H-Gebiet von 1,5 bis 11,0 umspannt werden können.

2.) Ferner sollte der Gehalt an starken Elektrolyten bei allen Mischungsverhältnissen konstant (0,1 normal) sein, da bisher nur wenige solcher Stufenlösungen bekannt und diese in einem nur beschränkten Intervall anwendbar sind. Da bei den meisten der bisher benutzten Mischungen der Elektrolytgehalt stark schwankt, können unter Umständen bei Indikatoren mit starkem Salzeinfluss grosse Fehler entstehen.

3.) Ausserdem sollten die Stammlösungen mit leicht zu reinigendem kristallisierten Verbindungen herstellbar sein, die auf Analysenwagen leicht abwägbar sind (sog. Urtitersubstanzen), um das lästige titrimetrische Einstellen zu umgehen.

Benutzt wurden folgende Stammlösungen:

1.) 0,05 mol. Oxalsäure (2 aq),
0,20 " Borsäure.

2.) 0,20 " Borsäure,
0,05 " Bernsteinsäure,
0,05 " Natriumsulfat, wasserfrei.

3.) 0,05 " Borax (10 aq).

4.) 0,05 " Soda, wasserfrei.

Die Oxalsäure- Borsäure- Mischung (Nr.1) erhielt keinen weiteren Salzzusatz, weil die Oxalsäure schon selbst weitgehend gespalten ist. Die Lösungen wurden in folgenden Kombinationen gemessen:

Nr.1 und Nr.2 (Reihe I),
Nr.2 und Nr.3 (Reihe II),
Nr.3 und Nr.4 (Reihe III).

Tab.27.

Reihe I.

Pufferlösungen von

p_H 1,410 bis 2,836.

Lösung 1 ccm	Lösung 2 ccm	ε_c (korr) Volt	p_H
50,0	0,0	0,3675	1,410
40,0	10,0	0,3745	1,531
30,0	20,0	0,3842	1,700
20,0	30,0	0,3969	1,920
10,0	40,0	0,4163	2,255
5,0	45,0	0,4304	2,500
0,0	50,0	0,4498	2,836

Die Reihe III ist zwar schon bekannt[1)], wurde aber noch einmal gemessen, weil die Messungen von K o l t h o f f gegen eine Veibel-Elektrode erfolgten und ausserdem für die reine Boraxlösung ein etwas tieferer Wert gefunden wurde (p_H= 9,22 gegen 9,20).

1). K o l t h o f f, Biochem. Ztschr. 189, 191 (1927).

Tab. 28.

Reihe II.

Pufferlösungen von p_H 2,836 bis 9,222.

Lösung 2 ccm	Lösung 3 ccm	ε_c (korr) Volt	p_H
50,0	0,0	0,4498	2,836
49,0	1,0	0,4591	2,997
47,5	2,5	0,4705	3,195
45,0	5,0	0,4874	3,487
42,5	7,5	0,5022	3,744
40,0	10,0	0,5151	3,967
37,0	13,0	0,5312	4,246
33,0	17,0	0,5565	4,684
30,0	20,0	0,5782	5,061
27,5	22,5	0,6049	5,523.
26,0	24,0	0,6294	5,948
25,0	25,0	0,6582	6,447
24,0	26,0	0,6857	6,923
22,5	27,5	0,7105	7,353
20,0	30,0	0,7333	7,748
15,0	35,0	0,7642	8,283
10,0	40,0	0,7858	8,656
5,0	45,0	0,8031	8,956
2,5	47,5	0,8111	9,095
0,0	50,0	0,8184	9,222

Die Messungen wurden bei 18,00° ± 0,01° C unter Berücksichtigung der Barometerkorrektur mit der in Fig. 2 und 3 dargestellten Apparatur ausgeführt. Die durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert betrug ± 0,1 Millivolt und war

Tab. 29.

Reihe III.

Pufferlösungen von p_H 9,222 bis 11,3.. .

Lösung 3 ccm	Lösung 4 ccm	ε_c (korr) Volt	p_H
50,0	0,0	0,8184	9,222
40,0	10,0	0,8234	9,309
30,0	20,0	0,8318	9,454
20,0	30,0	0,8450	9,682
15,0	35,0	0,8566	9,884
10,0	40,0	0,8721	10,152
5,0	45,0	0,8945	10,541
2,5	47,5	0,9106	10,819
0,0	50,0	($0,93_8$.)	(11,3..)

nur in Ausnahmefällen etwas grösser. Vergleichselektrode war eine 1/1 norm. Kalomelelektrode.

Die Substanzen waren alle sorgfältig gereinigt. Beim Abwiegen wurde der Luftauftrieb ausgeglichen. Besondere Vorsicht wurde bei der Reihe III angewandt, da die ungemischte Sodalösung ausserordentlich empfindlich gegen Kohlensäure ist. Beim Einsaugen der Lösung und Ausspülen der Elektrode wurde deshalb ein langes mit gekörntem Ätzkali gefülltes Rohr zwischen Elektrode und Mundstück eingeschaltet und die Berührung der Lösung mit der Zimmerluft möglichst vermieden. In Tab. 27, 28 und 29 sind die Mittelwerte angegeben (Fig. 13).

Tab.30.

Mischunsverhältnis der Stufenlösungen von halben zu halben Stufen für je 100 ccm fertige Mischung.

Stufe	Lösung 1 ccm	Lösung 2 ccm	Lösung 3 ccm	Lösung 4 ccm
1,5	84,1	15,9		
2,0	34,3	65,7		
2,5	10,0	90,0		
3,0		98,0	2,0	
3,5		$89,8_5$	$10,1_5$	
4,0		79,2	20,8	
4,5		69,1	30,9	
5,0		$60,8_5$	$39,1_5$	
5,5		55,2	44,8	
6,0		$51,7_5$	$48,2_5$	
6,5		$49,7_8$	$50,2_2$	
7,0		47,6	52,4	
7,5		43,4	56,6	
8,0		35,9	64,1	
8,5		24,4	75,6	
9,0		8,3	91,7	
9,5			54,6	45,4
10,0			25,3	74,7
10,5			11,0	89,0
11,0			3,0	97,0

Für ganze und halbe Stufen wurden die Werte teils rechnerisch und teils aus der Kurve graphisch interpoliert und auf ihre Richtigkeit hin geprüft (Tab. 30 und 31).

Tab. 31.

Zusammensetzung der Stufenlösungen
von halben zu halben Stufen.[1)]
(Gramme pro Liter Lösung.)

Stufe	Oxalsäure 2 aq	Bernsteinsäure	Borsäure	Na_2SO_4 wasserfrei	Borax 10 aq	Soda wasserfrei
1,5	5,3094	0,9379	12,3600	1,1290		
2,0	2,1604	3,8755	12,3600	4,6650		
2,5	0,6299	5,3088	12,3600	6,3903		
3,0		5,7807	12,1130	6,9584	0,3812	
3,5		5,2998	11,1059	6,3797	1,9347	
4,0		4,6718	9,7892	5,6235	3,9646	
4,5		4,0760	8,5408	4,9063	5,8898	
5,0		3,5893	7,5210	4,3206	7,4622	
5,5		3,2561	6,8227	3,9194	8,5392	
6,0		3,0525	6,3963	3,6744	9,1968	
6,5		2,9363	6,1627	3,5345	9,5724	
7,0		2,8078	5,8834	3,3798	9,9878	
7,5		2,5600	5,3643	3,0816	10,7885	
8,0		2,1176	4,4372	2,5490	12,2180	
8,5		1,4393	3,0159	1,7325	14,4100	
9,0		0,4896	1,0259	0,5893	17,4787	
9,5					10,4071	2,4053
10,0					4,8223	3,9575
10,5					2,0966	4,9152
11,0					0,5718	5,1390

1.) Diese Stufenlösungen werden von der Firma E. M e r c k, Darmstadt in trockener Form für je ein Liter fertig abgewogen hergestellt und können von der Firma E. L e i t z, Wetzlar bezogen werden.

Die vorstehende Untersuchung wurde im Wintersemester 1925 begonnen und, durch einen Unfall längere Zeit unterbrochen, im Wintersemester 1930 beendet. Herrn Professor Dr. A. T h i e l, unter dessen Leitung die Arbeit entstand, schulde ich für seine wertvollen Ratschläge und stete Hilfsbereitschaft meinen verbindlichsten Dank.

Herrn Professor Dr. K r o l l p f e i f f e r, s.Zt. technischer Direktor der Behringwerke, danke ich für liebenswürdige Überlassung der Caseïnlösungen und Herrn Priv.Doz. Dr. F l ö s s n e r für manchen wertvollen Ratschlag.

Am 3.Juli 1899 wurde ich, K a r l G u i d o S c h u l z, als Sohn des Fabrikanten Eduard Schulz und seiner Ehefrau Addy geb. Bellingrath, in Barmen geboren. In bin preussischer Staatsangehörigkeit und evangelischer Konfession.

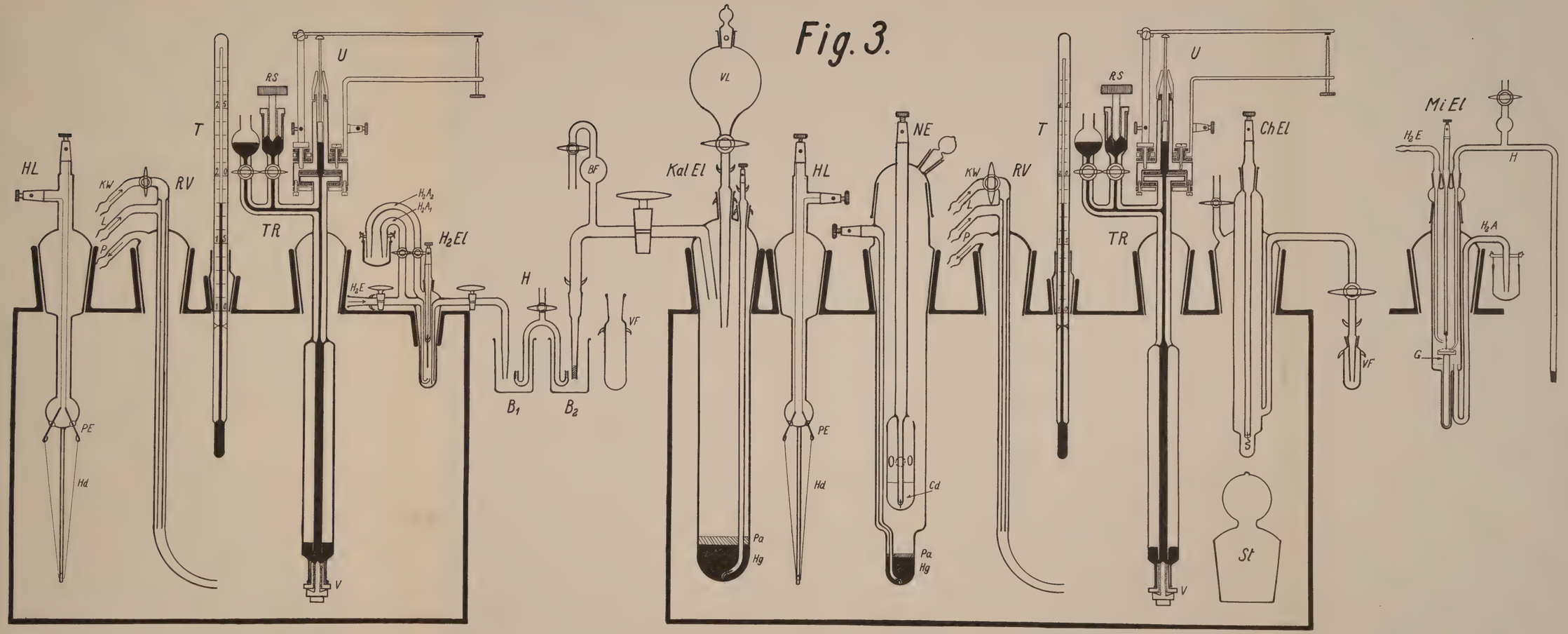
Von 1909 ab besuchte ich in Barmen das humanistische Gymnasium und von 1913 ab das Realgymnasium, das ich Ostern 1918 mit bestandenem Notabiturium verliess, um in den Heeresdienst einzutreten. Nach meiner Entlassung im April 1919 studierte ich in Bonn und Marburg Chemie. Das erste Verbandexamen bestand ich in Bonn am 30.11.1922, und das zweite in Marburg am 8.7.1924. Seit Wintersemester 1925 war ich, mit einer Unterbrechung, mit der vorliegenden Arbeit im Physikalisch-chemischen Institut der Universität Marburg beschäftigt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Bonn: R. Anschütz, Benrath, Bucherer, Dilthey, Kippenberger, Laar, Pfeiffer, Rimbach;

in Marburg: v.Auwers, Baars, Fraenkel, Krollpfeiffer, Meerwein, Reissert, Strecker, Thiel, Weigel, und Ziegler. Ihnen allen bin ich zu aufrichtigem Danke verpflichtet.

Fig. 3.


HL
KW
RV
T
RS
U
TR
H_2El
H_2A_2
H_2A_1
H_2E
H
BF
VF
B_1
B_2
PE
Hd
V
VL
KalEl
NE
Cd
Pa
Hg
ChEl
St
MiEl
H_2A
G

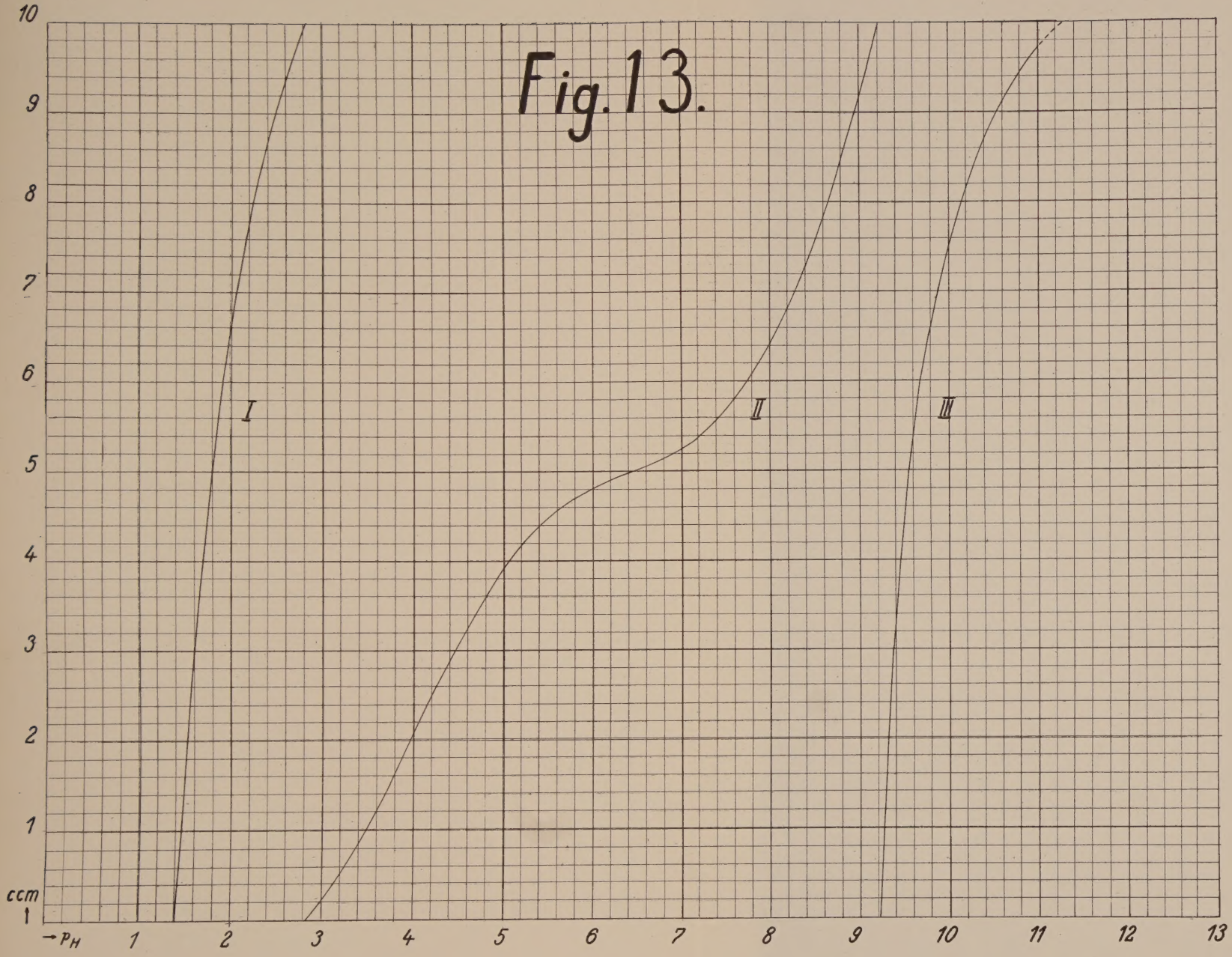


Fig. 13.
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ccm
→ p_H
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
I
II
III

Druck der Omnitypie Ges. Nachf. L. Zechnall Stuttgart